



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**“Desarrollo de una prueba de PCR múltiple para
detectar e identificar *Bartonella bacilliformis*”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Miguel Angel Francisco TALLEDO RIVERA

ASESOR

Mg. Ruth Hortensia GARCÍA DE LA GUARDA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Talledo, M. (2019). *Desarrollo de una prueba de PCR múltiple para detectar e identificar Bartonella bacilliformis*. Tesis para optar el grado de Magíster en Biología Molecular. Unidad de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	0000-0003-3011-4212
DNI o pasaporte del autor	25625144
Código ORCID del asesor	0000-0003-4801-5642
DNI o pasaporte del asesor	06041081
Grupo de investigación	Biotecnología para la remediación
Agencia financiadora	-
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Ciudad Universitaria UNMSM, Lima 12°03'30"S 77°05'00"O
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2008 - 2014
Disciplinas OCDE	1.06.03 – Bioquímica, Biología molecular URI https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 185-UPG-FCB-2019

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las 15:05 horas del día 25.7.2019 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Tesis presidido por:

Dra. Fanny Elizabeth Lazo Manrique	e integrado por
Dra. Susana Mónica Gutiérrez Moreno	(Miembro)
Dra. Liz Erika Cruz Pio	(Miembro)
Mg. Ruth Hortensia García de la Guarda	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara la Bachiller Don **MIGUEL ANGEL FRANCISCO TALLEDO RIVERA**.

Después de darse lectura al Expediente N° 185-UPG-FCB-19, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

“DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE PCR MÚLTIPLE PARA DETECTAR E IDENTIFICAR *Bartonella bacilliformis*”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: Excelente con la nota de 20

A continuación la Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el Grado Académico de Magíster en Biología Molecular al señor Bachiller **MIGUEL ANGEL FRANCISCO TALLEDO RIVERA**.

Siendo las 16:10 se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 25 días del mes de julio del año 2019.

Dra. Fanny Elizabeth Lazo Manrique
Profesora Principal a D.E.
PRESIDENTE
REGINA N° 13450

Mg. Ruth H. García de la Guarda
Profesor Principal a D.E.
ASESORA
REGINA N° 15295

Dra. Susana M. Gutiérrez Moreno
Profesora Principal a T. C.
MIEMBRO
DINA N° 13548

Dra. Liz Erika Cruz Pio
Profesora Auxiliar a T. C.
MIEMBRO
REGINA N° 17544

AGRADECIMIENTOS

A la memoria de mi querido padre.

A mi madre, a quien debo todo lo que he logrado.

A la mejor hermana del mundo.

A Katty, por su constante apoyo, presencia y cariño.

A la profesora Mag. Ruth García de la Guarda, mi asesora, por darme la oportunidad de apoyarla en su proyecto, por su comprensión y conocimientos.

A los profesores Dra. Susana Gutiérrez Moreno y Mag. Fernando Merino Rafael, mis mentores y amigos, por sus constantes consejos y guía.

Al Dr. Luis Javier Del Valle Mendoza, excelente profesional y amigo, por su apoyo en la participación del proyecto conjunto sobre *Bartonella*.

Al Dr. Michael Jaramillo Bobadilla, por la gentileza de compartir conmigo su importante experiencia en bioinformática para el desarrollo de este trabajo.

CONTENIDO

	Página
Abreviaturas	v
Lista de tablas	vi
Lista de figuras	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Un breve vistazo a la patogenia de <i>Bartonella</i> y las características de la bartonelosis	6
2.2 Principios Básicos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	9
2.3 Marcadores más usados para la detección molecular de <i>Bartonella</i>	11
2.3.1 Subunidad 16S del RNA ribosomal	12
2.3.2 Gen de la flagelina (<i>flaA</i>)	13
2.3.3 Gen de la proteína de division celular (<i>ftsZ</i>)	13
2.3.4 Gen de la enzima citrato sintasa (<i>gltA</i>)	14
2.3.5 Gen de la proteína de choque térmico (<i>groEL</i>)	14
2.3.6 Gen de la invasina putativa de eritrocitos (<i>ialA-B</i>)	15
2.3.7 Gen de la adhesina de matriz extracelular (<i>pap31</i>)	15
2.3.8 Región Espaciadora Intergénica del 16S-23S del RNA ribosomal	16
2.3.9 Gen de la enzima riboflavin sintasa (<i>ribC</i>)	17
2.3.10 Gen de la subunidad beta de la polimerasa RNA (<i>rpoB</i>)	18
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Material biológico	20
4.2 Propagación de <i>Bartonella bacilliformis</i>	20
4.3 Extracción de DNA del concentrado bacteriano	21

4.4 Cuantificación del DNA	22
4.5 Diseño de cebadores	22
4.6 Estandarización de la prueba PCR convencional	24
4.7 Determinación de la especificidad de los cebadores	25
4.8 Estandarización de la prueba PCR múltiple	26
4.9 Detección de los productos de amplificación	28
5. RESULTADOS	29
5.1 Diseño de cebadores	29
5.2 PCR convencional <i>in vitro</i>	29
5.3 Especificidad de los cebadores	33
5.3.1 Determinación de la especificidad <i>in vitro</i>	33
5.3.2 Determinación de la especificidad <i>in silico</i>	35
5.4 PCR múltiple <i>in vitro</i>	39
6. DISCUSIÓN	41
7. CONCLUSIONES	46
8. RECOMENDACIONES	47
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
10. ANEXOS	69

ABREVIATURAS

16s-rRNA	Subunidad 16S del RNA ribosomal procariótico
°C	Grados Celsius
μL	Microlitros
μm	Micras
ADN / DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPS	Desoxirribonucleótidos difosfato
ERIC-PCR	PCR de secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias
<i>flaA</i>	Gen de la Flagelina
ITS	Internal Transcribed Spacer, Región Espaciadora Intergénica
kDa	Kilodaltons
L	Litro
M	Molar
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
rep-PCR	PCR de secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
rpm	revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (medio de cultivo)
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
subsp.	Subespecie
Taq	Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
U	Unidades
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Especies y subespecies reconocidas de <i>Bartonella</i>	2
Tabla 2	Especies de <i>Bartonella</i> patógenas para el hombre, vectores y enfermedades que producen	3
Tabla 3	Cuadro sinóptico de los factores de patogenicidad en <i>Bartonella</i> spp.	6
Tabla 4	Marcadores frecuentemente usados para la identificación de <i>Bartonella</i> por PCR	12
Tabla 5	Mezcla de reacción utilizada para la PCR convencional	24
Tabla 6	Condiciones de amplificación para la PCR múltiple	25
Tabla 7	Listado de cepas probadas <i>in silico</i>	26
Tabla 8	Mezcla de reacción utilizada para la prueba PCR múltiple	27
Tabla 9	Condiciones de amplificación para la PCR múltiple	27
Tabla 10	Lista de cebadores con sus respectivas secuencias y blancos específicos en el genoma de <i>Bartonella</i>	29
Tabla 11	Resultados de la PCR <i>in silico</i> usando tres marcadores para detectar <i>Bartonella</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Tabla 12	Resultados de la PCR <i>in silico</i> usando tres marcadores para detectar <i>Bartonella bacilliformis</i> y varias especies de <i>Brucella</i>	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Curso de la infección por <i>Bartonella</i>	8
Figura 2	Sistemas Trw y VirB/VirD4 utilizados por bartonelas	8
Figura 3	Modalidades de PCR.	10
Figura 4	Protocolo de PCR múltiple.	11
Figura 5	Región Espaciadora Intergénica	17
Figura 6	Protocolo para el aislamiento y propagación de cepas de <i>Bartonella</i>	21
Figura 7	Protocolo para la extracción del DNA del concentrado bacteriano	22
Figura 8	Amplificación por PCR de los marcadores ITS, <i>flaA</i> y 16S-rRNA.	30
Figura 9	Amplificación por PCR de los marcadores ITS, <i>flaA</i> y 16S-rRNA a partir de DNA genómico de <i>Bartonella bacilliformis</i>	31
Figura 10	Amplificación por PCR del marcador 16S-rRNA a partir de DNA genómico de un aislado clínico de <i>Bartonella bacilliformis</i>	32
Figura 11	Amplificación por PCR de los marcadores <i>flaA</i> e ITS a partir de DNA genómico de cepas bacterianas de origen hospitalario diferentes a <i>Bartonella</i>	34
Figura 12	PCR <i>in silico</i> usando los cebadores diseñados contra varias cepas de <i>Bartonella</i> y otras cepas.	36
Figura 13	PCR <i>in silico</i> usando los cebadores diseñados contra <i>Bartonella bacilliformis</i> KC583 y otras cepas.	38
Figura 14	Amplificación por PCR múltiple a partir del DNA genómico de un aislado clínico de <i>Bartonella bacilliformis</i>	40
Figura 15	Interfase parcial del programa BIOEDIT	69
Figura 16	Interfase parcial del programa FastPCR	70
Figura 17	Interfase del programa ClustalX	71
Figura 18	Esquema del cálculo de la concentración de DNA de <i>Bartonella</i>	72

RESUMEN

El género *Bartonella* comprende bacterias capaces de infectar glóbulos rojos y células endoteliales, y que causan al menos 3 enfermedades humanas: la “enfermedad de Carrión”, por *Bartonella bacilliformis*, la “fiebre de las trincheras”, por *Bartonella quintana*, y la “enfermedad del arañazo del gato”, por *Bartonella henselae*. Las especies patógenas reconocidas de *Bartonella* han ido en aumento durante los últimos veinte años. En el Perú la infección más frecuente es la Enfermedad de Carrión, causada por *Bartonella bacilliformis*; sin embargo, hay reportes de otras bartonelosis en zonas endémicas, por lo que se requiere de un diagnóstico diferencial rápido y confirmativo.

El objetivo de este estudio fue desarrollar una prueba basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa con varios marcadores (PCR múltiple), para la detección e identificación de *Bartonella bacilliformis* en un solo ensayo.

La bacteria se propagó en agar Columbia con sangre de carnero al 10%, y fue incubada a 30°C con 5% de CO₂ y humedad saturada. Se extrajo el DNA de las bacterias cosechadas, así como de otras especies bacterianas. Se diseñaron cebadores específicos para 3 marcadores presentes en *Bartonella* spp. (*flaA*, ITS y 16S-rRNA) para diferenciar a *B. bacilliformis* con respecto a otras especies, incluso algunas no relacionadas a ella. Se trabajó con un aislado clínico de *Bartonella bacilliformis* (USM-LMM-003) procedente del Cusco. se realizaron las pruebas de PCR múltiple con estas cepas para estandarizar el método y evaluar su utilidad.

Se ha desarrollado un protocolo de PCR múltiple capaz de detectar e identificar bacterias del género *Bartonella*, con cebadores diseñados en este estudio y dirigidos a marcadores específicos. El protocolo de la PCR múltiple desarrollado en este estudio es útil para la detección e identificación confirmativa de *Bartonella bacilliformis* en una sola prueba, y también permite diferenciar a *Bartonella bacilliformis* respecto de otras especies de *Bartonella* que es imposible determinar con otras pruebas.

Palabras clave: *Bartonella*, *Bartonella bacilliformis*, Enfermedad de Carrión, marcadores moleculares, PCR múltiple.

ABSTRACT

Bartonella is a genus that includes bacteria able to infect red blood cells and endothelial cells, causing at least 3 well-known human diseases: Carrion's Disease by *Bartonella bacilliformis*, Trench Fever by *Bartonella quintana*, and Cat Scratch Disease by *Bartonella henselae*. The number of known pathogenic *Bartonella* species has been increasing over the past twenty years. In Peru, the most common infection is Carrion's Disease caused by *Bartonella bacilliformis*; however, there are reports of other bartonellosis in endemic areas and therefore a rapid differential and confirmatory diagnosis is required.

The goal of this study was to develop a test based on the Polymerase Chain Reaction with several markers (multiplex PCR), allowing the detection and identification of pathogenic *Bartonella* species, in a single trial.

A clinical isolate of *Bartonella bacilliformis* (USM-LMM-003) from Cusco was streaked on Columbia 10% Sheep Blood Agar plates, which were incubated at 30 °C with 5% CO₂ and saturated humidity. DNA was extracted from the harvested bacteria as well as from other bacterial species. Specific primers for 3 markers on *Bartonella* spp. (*flaA*, ITS and 16S-rRNA) were designed to differentiate *B. bacilliformis* with respect to other species of the genus. multiplex PCR was run on these strains to standardize the method and assess its usefulness.

A multiplex PCR protocol able to detect and identify bacteria of the genus *Bartonella* was developed, proving its specificity with the designed primers targeted to *flaA*, ITS and 16S-rRNA markers. The multiplex PCR protocol developed in this study is useful for screening and confirmatory identification of *Bartonella bacilliformis* in a single test, and it also allows the differentiation of *Bartonella bacilliformis* with respect to other *Bartonella* species impossible to determine with other assays.

Key words: *Bartonella*, *Bartonella bacilliformis*, Carrion's disease, molecular markers, multiplex PCR.

1. INTRODUCCIÓN

Bartonella es un microorganismo cocobacilar Gramnegativo pleomórfico, con un tamaño que bordea los 0.3 μm a 1 μm . Los miembros de este género son patógenos intracelulares facultativos, muchos de los cuales son hemótrofos (capaces de infectar glóbulos rojos) y también infectan células endoteliales (Mavrouli *et al.*, 2016). Todo este grupo es de difícil mantenimiento *in vitro*. Pueden infectar una variedad de hospederos mamíferos y al menos 3 son patógenos relativamente comunes del humano: *Bartonella bacilliformis*, causante de la “enfermedad de Carrión”, *B. quintana*, causante de la “fiebre de las trincheras”, y *B. henselae*, causante de la “enfermedad del arañazo del gato”, (Márquez *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2007; Chomel *et al.*, 2005; Anderson y Neuman, 1997). En los últimos años el número de especies patógenas de *Bartonella* se ha incrementado significativamente (Johnson *et al.*, 2003) (Tabla 1). Actualmente este género contiene más de 30 registros de *Bartonella* spp. y 25 de estos han sido identificados a nivel de especie, como se muestra en la Tabla 1 y tres (*B. bacilliformis*, *B. quintana* y *B. henselae*), están implicadas en infecciones frecuentes (Arvand *et al.*, 2008; Arvand y Chäd, 2006; Ferrés *et al.*, 2005; Carroll *et al.*, 2000; Pachas, 2000) (Tabla 2).

En el Perú la infección más frecuente es la causada por *Bartonella bacilliformis*: la Enfermedad de Carrión, que es endémica y reemergente (Gonzales, 2007), pero también hay reportes de casos de otras bartonelosis en las zonas endémicas de dicha enfermedad, habiéndose encontrado *B. quintana*, *B. elizabethae* (Birtles *et al.*, 1999) y *B. vinsoni* subsp. *berkhoffii* (Parola *et al.*, 2002), por lo que el diagnóstico diferencial y confirmativo de laboratorio es muy importante.

Otro componente que suma al creciente problema de *Bartonella* es el potencial de las enfermedades infecciosas emergentes, que en mayoría son zoonosis originadas en el ambiente silvestre (Jones, K. *et al.*, 2008). Se han hallado más de 60 especies de murciélagos presentando infecciones por *Bartonella* spp. Incluyendo Sudamérica, Centroamérica, África, Europa y el Sudeste Asiático (McKee *et al.*, 2017).

Tabla 1
Especies y subespecies reconocidas de *Bartonella*

Especie de <i>Bartonella</i>	Referencia
<i>B. acomydis</i>	Sato <i>et al.</i> 2013
<i>B. alsatica</i>	Heller <i>et al.</i> 1999
<i>B. ancashensis</i>	Mullins <i>et al.</i> 2015
<i>B. apis</i>	Kešnerová <i>et al.</i> 2016
<i>B. bacilliformis</i>	Brenner <i>et al.</i> , 1991
<i>B. birtlesii</i>	Bermond <i>et al.</i> 2000
<i>B. bovis</i>	Bermond <i>et al.</i> , 2002
<i>B. callosciuri</i>	Sato <i>et al.</i> , 2013
<i>B. capreoli</i>	Bermond <i>et al.</i> 2002
<i>B. chomelii</i>	Maillard <i>et al.</i> , 2004a
<i>B. clarridgeiae</i>	Lawson y Collins, 1996
<i>B. coopersplainsensis</i>	Gundi <i>et al.</i> , 2009
<i>B. doshiae</i>	Birtles <i>et al.</i> , 1995
<i>B. elizabethae</i>	Brenner <i>et al.</i> 1993
<i>B. florencae</i>	Mediannikov <i>et al.</i> 2013a
<i>B. fuyuanensis</i>	Li <i>et al.</i> 2015
<i>B. grahamii</i>	Birtles <i>et al.</i> , 2009
<i>B. heixiaziensis</i>	Li <i>et al.</i> 2015
<i>B. henselae</i>	Brenner <i>et al.</i> 1993
<i>B. jaculi</i>	Sato <i>et al.</i> 2013
<i>B. japonica</i>	Inoue <i>et al.</i> 2010
<i>B. koehlerae</i>	Droz <i>et al.</i> 2000
<i>B. pachyuromydis</i>	Sato <i>et al.</i> , 2013
<i>B. peromysci</i>	Birtles <i>et al.</i> 2009
<i>B. queenslandensis</i>	Gundi <i>et al.</i> 2009
<i>B. quintana</i>	Brenner <i>et al.</i> 1993
<i>B. rattaaustraliani</i>	Gundi <i>et al.</i> 2009
<i>B. rochalimae</i>	Eremeeva <i>et al.</i> 2012
<i>B. schoenbuchensis</i>	Dehio <i>et al.</i> 2001
<i>B. senegalensis</i>	Mediannikov <i>et al.</i> 2013b
<i>B. silvatica</i>	Inoue <i>et al.</i> 2010
<i>B. talpae</i>	Birtles <i>et al.</i> 2009
<i>B. taylorii</i>	Birtles <i>et al.</i> 2009
<i>B. tribocorum</i>	Heller <i>et al.</i> 1998
<i>B. vinsonii</i>	Brenner <i>et al.</i> 1993
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Welch <i>et al.</i> 2000
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Kordick <i>et al.</i> 1996
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	Kordick <i>et al.</i> 1996

(modificado a partir de Jacomo *et al.*, 2002)

Tabla 2
Especies de *Bartonella* patógenas para el hombre, vectores y enfermedades que producen

Especie	Vector	Enfermedad
<i>B. quintana</i>	Piojo <i>Pediculus humanus corporis</i>	Fiebre de las trincheras Angiomatosis bacilar Endocarditis Linfadenopatía crónica Bacteriemia Hemorragia gastrointestinal Alteraciones neurológicas
<i>B. henselae</i>	Pulgas <i>Ctenocephalides felis</i>	Enf. del arañazo del gato Angiomatosis bacilar Endocarditis Bacteriemia Peliosis bacilar Neuritis óptica Meningitis séptica Granuloma pulmonar Granuloma hepático Parálisis facial Paroniquia
<i>B. bacilliformis</i>	<i>Lutzomyia</i>	Enfermedad de Carrión <ul style="list-style-type: none"> • Anémica • Eruptiva
<i>B. elizabethae</i>	Pulgas	Endocarditis
<i>B. clarridgeiae</i>	Pulgas <i>Ctenocephalides felis</i>	Enf. del arañazo del gato
<i>B. vinsonii</i>	Probablemente garrapatas	Endocarditis
<i>B. grahamii</i>	Se desconoce	Infección intraocular

(Fuente: Pachas, 2001)

Muchas veces la reemergencia de estas afecciones hace difícil hacer un seguimiento o establecer una relación entre muestras aisladas de pacientes, y este punto es de especial interés en el caso de *Bartonella bacilliformis* en nuestra región (Pons *et al.*, 2016).

El diagnóstico directo de *Bartonella bacilliformis* se realiza por frotis de sangre periférica y coloración con Leishman, Giemsa o Wright. Esta metodología presenta la enorme ventaja de que está disponible en cualquier laboratorio, requiere poca destreza técnica y permite detectar a los glóbulos rojos infectados por *Bartonella* en cualquiera de sus formas, ya sea bacilar, cocobacilar o cocoide. A veces, sin embargo, se presentan algunos inconvenientes que se podrían expresar como desventajas, ya que es posible caer en error al confundir las formas cocoides con los artefactos observados en basófilos, llamado también punteado de basófilos; también se presentan problemas al preparar extendidos gruesos. Peor aún que los detalles técnicos, la sensibilidad general de la prueba

es baja, entre 30 y 70% si la muestra procede de pacientes en fase hemática y puede alcanzar hasta menos del 10% en muestras originadas de pacientes en fase verrucosa (Ventura y Padilla, 2006).

Inclusive los procedimientos bioquímicos, tal como el análisis de ácidos grasos de la pared celular, no es capaz de discriminar a las diferentes especies de *Bartonella*. El diagnóstico también se puede lograr mediante el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de fragmentos amplificados de DNA, como el de la Región Espaciadora Intergénica 16S-23S del RNA Ribosomal (ITS) o el gen de la enzima citrato sintasa (Chomel *et al.*, 2016; Diddi *et al.*, 2013; Renesto *et al.*, 2001).

Ello obliga a la confirmación por aislamiento bacteriológico, a través de hemocultivos o cultivos de biopsias en medios especiales, como el Agar Columbia con sangre de carnero al 10% y fase líquida con medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (Maguiña, 2008). Un buen porcentaje de aislamientos (70%) se logra en las dos primeras semanas de incubación, obteniéndose el resto en las siguientes dos semanas; no obstante, en ocasiones puede tardar hasta 3 meses, lo que representa uno de los principales problemas de cultivo de estos microorganismos, y lo ha sido desde los inicios de su estudio clínico (Noguchi, 1928).

En este contexto, los métodos moleculares, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), son muy requeridos para la identificación de patógenos, por su especificidad, facilidad de uso y velocidad de proceso; por tanto, representan una buena alternativa al problema de la identificación de especies patógenas para el hombre (Romero, 2017). Este tipo de prueba basa su especificidad en el diseño de cebadores adecuados dirigidos a regiones del DNA bacteriano que puedan servir para identificar y además diferenciar especies de *Bartonella* y otras estrechamente relacionadas, como es el caso de *Agrobacterium* y *Brucella*. Estas regiones deben ser cuidadosamente escogidas para brindar un patrón de bandas que permita la clara distinción entre las posibles cepas probadas. Aunque los protocolos basados en la PCR ofrecen múltiples ventajas, también tienen puntos débiles, como, por ejemplo, el riesgo de contaminación cruzada, lo cual es un gran problema, sobre todo cuando se manejan múltiples muestras al mismo tiempo en el laboratorio de análisis molecular (Renesto *et al.*, 2001). Por ello desde hace algunos años se están

desarrollado protocolos de PCR en tiempo real para detectar *B. bacilliformis* en mosquitos (Romero, 2004).

Actualmente, los métodos de la biología molecular se han convertido en herramienta fundamental para la comprensión de estas interacciones, muchos marcadores genéticos compartidos por especies de *Bartonella* son utilizados para estudiar la historia evolutiva de las zoonosis que estos procariontes generan, entendiendo así de dónde proceden y en qué dirección van, dependiendo del contexto (Frank, *et al.*, 2018). Por ello, se entiende la tendencia a desarrollar métodos que permitan diferenciar varias especies, más que detectar una en particular.

La mayoría de trabajos realizados al respecto han sido orientados a detectar fundamentalmente a *B. bacilliformis*, pero no a diferenciarla de otras especies de *Bartonella*. Hasta la fecha no se cuenta con publicaciones sobre pruebas para diferenciar en un solo ensayo a las especies de *Bartonella*, por lo que en esta investigación se plantea desarrollar una prueba PCR múltiple con tres marcadores (PCR múltiple) con este fin, además de diferenciarla de las principales especies de *Bartonella* que infectan al hombre. El desarrollo de esta prueba será útil para confirmar la identificación de la especie de aislados bacterianos en 1 a 2 días como máximo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Un breve vistazo a la patogenia de *Bartonella* y las características de la bartonelosis

La preferencia de *Bartonella* por invadir glóbulos rojos es uno de los factores más individualizados entre procariontes. Para entender la patogénesis de esta bacteria se han llevado a cabo muchos estudios genéticos (Battisti y Minnick, 1999; Vayssier-Taussat *et al.*, 2010), en cultivo celular apropiado (Fuhrmann *et al.*, 2001; Benson *et al.*, 1986) o en modelos animales (Schüle *et al.*, 2001). Todo esto ha dado luces para entender los mecanismos moleculares que gobiernan la patogénesis de esta bacteria. Los factores de patogenicidad conocidos se citan en la Tabla 3.

Tabla 3
Cuadro sinóptico de los factores de patogenicidad en *Bartonella* spp.

Factor(es) de patogenicidad	Función
Factor Angiogénico	Estimula la proliferación de células endoteliales
Deformina	Deformación de membranas del eritrocito
Flagelos	Motilidad, unión a e invasión de eritrocitos
Hemolisina	Hemólisis dependiente del contacto
Hbp/Pap31	Familia Omp de proteínas de unión a hemina
IalA-B	Invasinas putativas de eritrocitos
Iba	Autotransportador, adhesinas putativas
LPS	Lipopolisacárido
Omp43	Adhesina putativa de células endoteliales
Pili	Pili similares a Tipo IV, motilidad, adhesión celular
Trw	T4SS, establecimiento de infección intraeritrocítica
VirB-D4-Bep	T4SS, subversión de la función celular endotelial

(Fuente: Dehio, 2004)

Las infecciones por *Bartonella* pueden aparecer aisladamente o a veces como brotes epidémicos, siempre en relación a las condiciones sanitarias, reservorios y vectores (Blanco y Raoult, 2005). La mayoría de especies está ampliamente distribuida en el planeta, excepto *B. bacilliformis*, que se halla restringida a ciertas regiones de los Andes (Manfredi *et al.*, 2005).

La transmisión de la bacteria de este género depende del hospedero y de los vectores. Para el caso de *B. henselae* y *B. clarridgeiae*, el gato es el reservorio natural, mientras que para el caso de *B. vinsonii*, *B. grahamii*, *B. doshiae* y *B. taylorii*; los reservorios naturales son ratones campestres de la especie *Peromyscus leucopus*. En el caso de *B. bacilliformis* y *B. quintana*, los humanos son el único reservorio conocido (Castillo *et al.*, 2008; Berghoff *et al.*, 2007; Chomel *et al.*, 2006; Blanco y Raoult, 2005).

B. bacilliformis se distribuye en relación al vector *Lutzomyia verrucarum*, que se encuentra habitando la región andina de Perú, Ecuador y Colombia. La pulga del gato, *Ctenocephalides felis*, es otro de los vectores potenciales de bacterias del género *Bartonella*. De este artrópodo se ha aislado a *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. quintana* y *B. koehlerae* (Li *et al.*, 2007; Blanco y Raoult, 2005). Más recientemente se ha publicado que la garrapata *Ixodes ricinus* es capaz de hospedar a *Bartonella*, aunque no queda claro su rol en la transmisión a los seres humanos (Eremeeva *et al.*, 2007).

Estos microorganismos presentan tropismo por los eritrocitos y por células endoteliales (Kirby y Nekorchuk, 2002), lo cual explica parcialmente por qué no se les encuentra en la sangre después de la inoculación experimental (Blanco y Raoult, 2005) (Figura 1). Producen además una sustancia conocida como deformina, que causa invaginaciones en la membrana del glóbulo rojo (Harms y Dehio, 2012). Al abandonar los eritrocitos, esta bacteria infecta las células endoteliales. Se empiezan a producir entonces citoquinas mediadoras de la inflamación, responsables de la angiomatosis bacilar y la verruga peruana (Vega y Ariza, 2008). (Figuras 1 y 2).

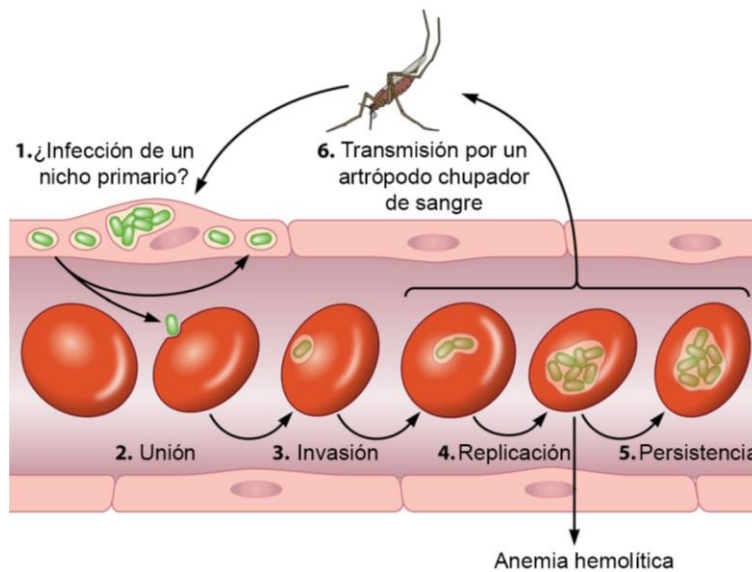


Figura 1. Curso de la infección por *Bartonella*. (Adaptado y modificado a partir de la figura 6 de Gomes y Ruiz, 2018).

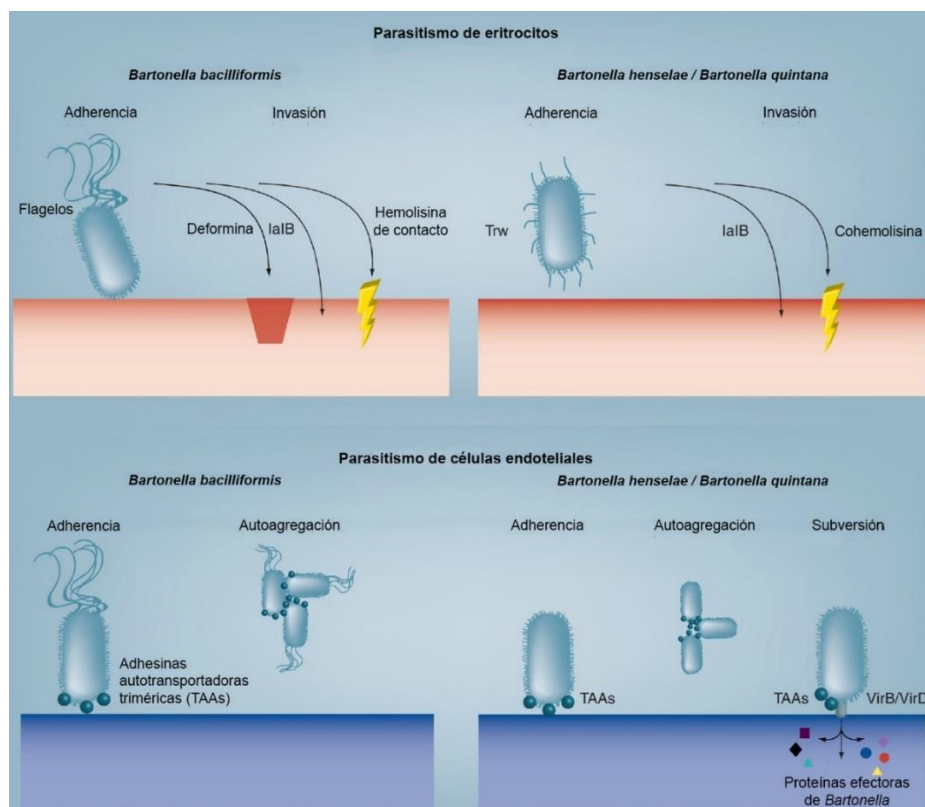


Figura 2. Sistema Trw (pilina) y el sistema VirB/VirD4 (sistema de secreción tipo IV de traslocación de efector), utilizados por bartonelas ancestrales (*Bartonella bacilliformis*) y las modernas (*Bartonella henselae* y *Bartonella quintana*) para entrar en contacto y parasitar eritrocitos humanos y células endoteliales). (Adaptado y modificado de Minnick y Battisti, 2009).

Las manifestaciones clínicas de la infección por *Bartonella bacilliformis* varían ampliamente, desde cuadros subclínicos hasta enfermedad aguda fulminante, incluyendo hemólisis severa o desarrollo de tumores vasculares. La historia natural de la enfermedad presenta dos fases: anémica y eruptiva, con un período intermedio de naturaleza asintomática (Maguiña y Gotuzzo, 2000).

La fase anémica es la forma de presentación más grave, iniciándose gradualmente y en pocos días se presenta una anemia severa, con posibles complicaciones infecciosas y no infecciosas, compromiso pulmonar, hepático, renal, cardiovascular y neurológico y casos graves, falla orgánica multisistémica y muerte. En más del 60% de los casos afecta a niños menores de 14 años, fundamentalmente por la inmunosupresión que sucede a la infección y que conlleva a la aparición de complicaciones (Pons *et al.*, 2017; Pachas, 2001).

Sigue el período intercalar, en el que desaparecen la fiebre, síntomas y signos, y no se encuentran bacterias circulantes; es asintomático y dura de semanas hasta varios meses (Montoya *et al.*, 1998).

La fase eruptiva se presenta por lo general en niños que viven en áreas endémicas. Puede ocurrir posteriormente a la fase aguda o sin ella; los síntomas son leves: malestar general leve, dolor de cabeza, fiebres leves, dolor articular y muscular; comúnmente es asintomática. Las lesiones no son dolorosas y presentan superficies lisas, de color rojo púrpura o rojo violáceo, individuales o múltiples y que suelen sangrar con facilidad.

2.2 Principios Básicos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es método de amplificación de ácidos nucleicos más ampliamente usado. Esta técnica fue desarrollada por Kary Mullis en 1983 (Mullis, 1990). Se basa en la habilidad de la DNA polimerasa de copiar una cadena del DNA por elongación de cadenas complementarias iniciadas a partir de un par de cebadores oligonucleótidos químicamente sintetizados. Incluye ciclos repetidos de amplificación de las secuencias seleccionadas de ácidos nucleicos (Mullis y Faloona, 1987). Cada ciclo consiste en tres pasos: a) un paso de desnaturalización de DNA, en el cual la doble hebra del DNA blanco es separada; b) un paso de hibridización del cebador, llevado a cabo a temperatura más baja, y en el cual los cebadores se pegan a sus secuencias complementarias (blanco), y c) un paso de reacción de extensión, en el que la polimerasa DNA extiende las

secuencias entre los cebadores. Al final de cada ciclo (que incluye los tres pasos antes mencionados), la cantidad de productos PCR se duplica. Todo el proceso se lleva a cabo en un termociclador programable. Por lo general, un desarrollo de 30 a 50 ciclos térmicos resulta en un aumento exponencial del número total de copias sintetizadas de DNA (White *et al.*, 1992; Eisenstein, 1990).

La PCR múltiple o *Multiplex PCR* es una reacción en la que se introducen en el mismo tubo de reacción dos o más pares de cebadores específicos dirigidos a diferentes blancos. De esta forma, más de una sola secuencia de DNA blanco puede ser amplificada al mismo tiempo (Edwards y Gibbs, 1994). Los cebadores que se usan en esta modalidad deben ser cuidadosamente diseñados con el objeto de tener temperaturas de hibridación similares, lo que con frecuencia requiere pruebas empíricas extensas (Figuras 3 y 4).

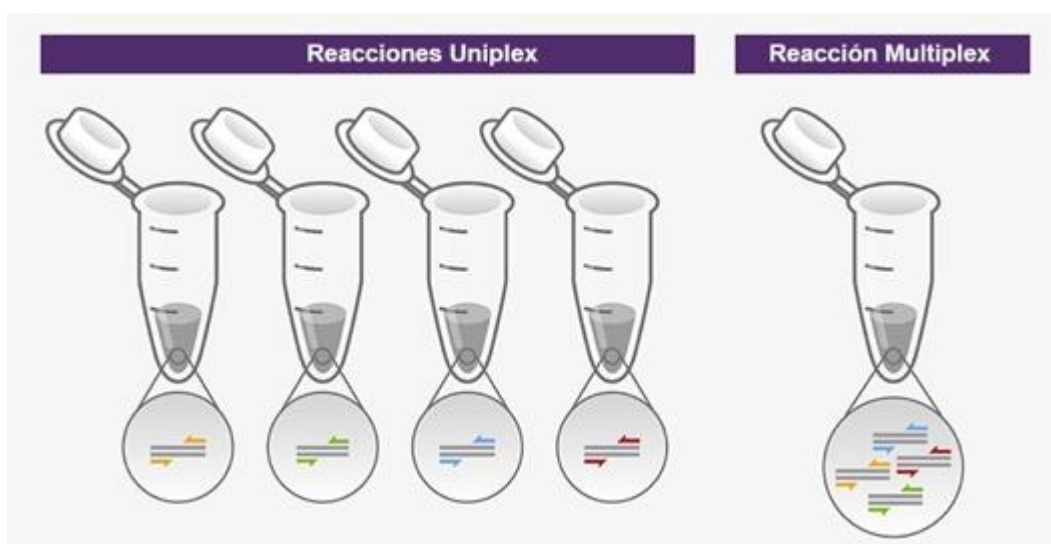


Figura 3. Modalidades de PCR. Reacciones uniplex, con un solo juego de cebadores y una reacción multiplex, con varios juegos de cebadores usados al mismo tiempo en la reacción (Modificado de https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/Cloning/Images/0616/pcr-methods-WE41324_Fig07.jpg)

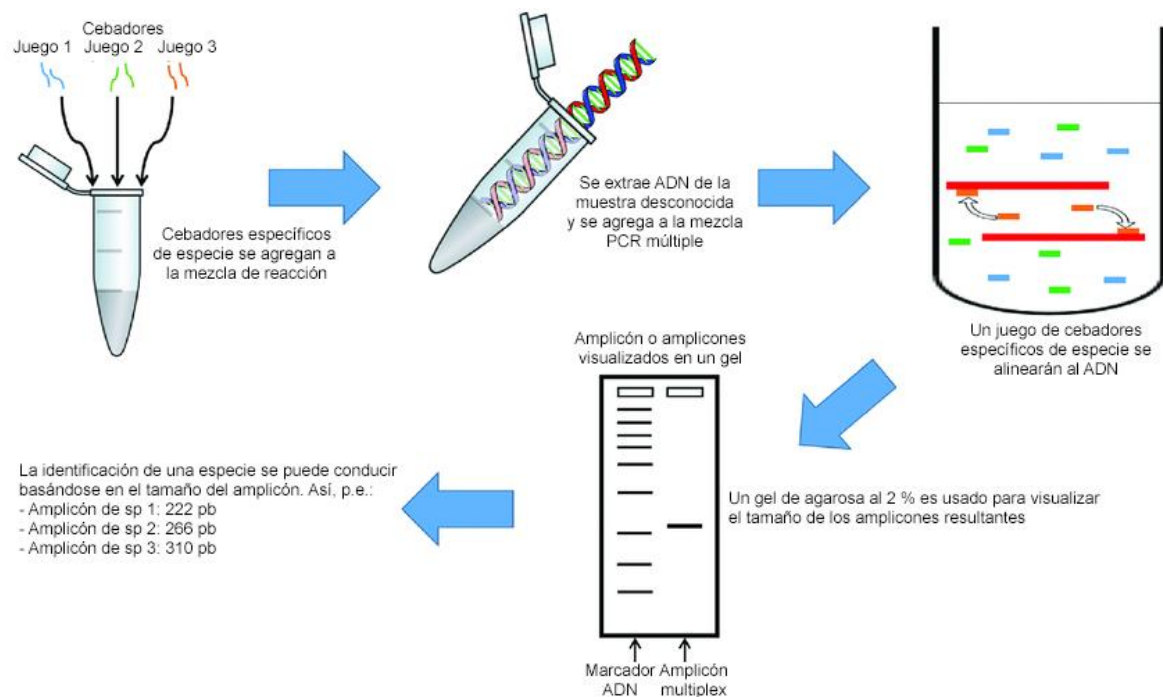


Figura 4. Protocolo PCR múltiple. Este protocolo de PCR múltiple muestra la búsqueda de tres marcadores presentes en la muestra, en la misma reacción PCR (Adaptado y modificado de Ewart *et al.*, 2018).

2.3 Marcadores más usados para la detección molecular de *Bartonella*

Los intentos de desarrollar un protocolo basado en la PCR para la detección de *Bartonella* no son nuevos. Dado el conocimiento fino de la estructura genética de esta bacteria, se han ido caracterizando genes que puedan servir como blancos para su detección. Algunos de los marcadores más comúnmente citados en la bibliografía se hallan en la Tabla 4.

Tabla 4
Marcadores frecuentemente usados para la identificación de *Bartonella*
por PCR

Marcador	Descripción	Referencia
<i>flaA</i>	gen de la flagelina del flagelo	Sander <i>et al.</i> , (2000)
<i>ftsZ</i>	proteína de división celular	Ehrenborg <i>et al.</i> , (2000)
<i>gltA</i>	gen de la enzima citrato sintasa	Birtles y Raoult, (1996)
<i>groEL</i>	gen de la proteína de choque térmico	Haake <i>et al.</i> , (1997); Marston <i>et al.</i> (1999)
<i>ialB</i>	gen de la invasina putativa de eritrocitos	Coleman y Minnick (2001); Flores (2008)
ITS	Región Espaciadora Intergénica 16S-23S del RNA ribosomal (Internal Transcribed Spacer)	Houpikian y Raoult (2001)
<i>pap31</i>	adhesina de matriz extracelular	Dabo <i>et al.</i> (2006)
<i>rpoB</i>	gen de la subunidad beta de la RNA polimerasa	Renesto <i>et al.</i> , (2001)
<i>ribC</i>	gen de la riboflavin sintasa	Johnson <i>et al.</i> , (2003); Bereswill <i>et al.</i> (1999)

Se desarrolló un protocolo PCR para diferenciar *Rochalimaea henselae* (actualmente *Bartonella henselae* y causante de la “Enfermedad del Arañazo del Gato”) de *R. quintana* (actualmente *Bartonella quintana* y causante de la “Fiebre de las Trincheras”), obteniendo un producto de 414 pb mediante el uso de cebadores degenerados (Anderson *et al.*, 1994).

2.3.1 Gen de la subunidad 16S del RNA ribosomal

La elección de secuencias del gen de la subunidad 16S del RNA ribosomal (16S-rRNA) como blanco de detección tiene sus raíces en su uso con fines de ordenamiento filogenético. El 16S-rRNA siempre se ha preferido al gen de la subunidad 23S del RNA ribosomal (23S-rRNA) por su tamaño menor, lo cual lo hace más rastreable en el análisis de secuencias (Del Valle *et al.*, 2014; Pitulle *et al.*, 2002; Koehler *et al.*, 1997). Múltiples trabajos usan este marcador como blanco genérico para detectar especies de *Bartonella* (Gomes *et al.*, 2016; Suh

et al., 2010; Cadenas *et al.*, 2008; Garre *et al.*, 2008; Lydy *et al.*, 2008; Pitulle *et al.*, 2002; Sander *et al.*, 1999) porque presenta variaciones mínimas en su secuencia, las que permiten detectar con seguridad a *Bartonella* o a especies muy relacionadas (La Scola *et al.*, 2002).

2.3.2 Gen de la flagelina (*flaA*)

La flagelina (FlaA), una proteína de 42 kDa, es el mayor componente del flagelo de *Bartonella bacilliformis*, participa indirectamente en la invasión de los eritrocitos humanos (Xu y Chai, 2002) y ha sido un marcador utilizado para estudios inmunológicos acerca de la invasión de glóbulos rojos humanos desde su aislamiento e identificación tiempo atrás (Scherer *et al.*, 1993). Secuencias del gen que la codifica (*flaA*) fueron utilizadas en ensayos de PCR para la detección de *B. clarridgeiae* (aunque varias bartonelas pueden formar pili, solo *B. bacilliformis* y *B. clarridgeiae* poseen flagelos) (Sander *et al.*, 2000). También se ha usado este marcador para el estudio de *B. bacilliformis* en Perú (Hambuch *et al.*, 2004). La flagelina y otros marcadores han sido usados para el desarrollo de probables vacunas contra este germen (Henríquez *et al.*, 2015).

2.3.3 Gen de la proteína de división celular (*ftsZ*)

Un antígeno de 75 kDa en *B. bacilliformis* fue identificado como homólogo de FtsZ, una proteína esencial de la división celular, altamente conservada en procariontes (Kelly *et al.*, 1998). Poco después, ciertos cebadores específicos para este y otros marcadores fueron incluidos en un ensayo basado en la PCR con el objeto de identificar a *B. henselae*, concluyendo que es un marcador útil, sobre todo cuando se trata de estudiar la filogenia intraespecies (Ehrenborg *et al.*, 2000). Gracias a la comparación de secuencias parciales de este gen, se logró clasificar y diferenciar plenamente a especies de *Bartonella*, como *B. quintana*, *B. henselae*, *B. bacilliformis* y *B. clarridgeiae* (Zeaiter *et al.*, 2002). Incluso se propuso el descubrimiento de una nueva especie, *Candidatus Bartonella rodoniensis*, basándose en la secuencia de este gen, junto con *gltA* y *rpoB* (Laroche *et al.*, 2017).

2.3.4 Gen de la enzima citrato sintasa (*gltA*)

La enzima citrato sintasa es la primera del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y es un regulador clave de la producción de ATP intracelular tanto en procariontes como en eucariontes. Un fragmento de 940 pb del gen de la enzima citrato sintasa (*gltA*) así como una secuencia del gen de la subunidad 16S-rRNA fueron usados para reconocer diferentes cepas de *Bartonella* y clasificarlas filogenéticamente (Birtles y Raoult, 1996). A nivel nacional, se realizó una PCR – RFLP para confirmar la infección por *Bartonella bacilliformis* y *B. henselae* utilizando a *gltA* (Padilla *et al.*, 1998). Este marcador, entre otros, se utilizó para resaltar el valor de la genotipificación en los estudios epidemiológicos de *Bartonella bacilliformis* (Birtles *et al.*, 2002). La detección molecular de varias especies de *Bartonella* fue realizada con base en este y otros marcadores (Rolain *et al.*, 2004). También fue ideal para realizar un extenso estudio de diversidad genética de especies de *Bartonella*, además del uso de *rpoB* (Inoue *et al.*, 2008). En Brasil, *gltA* fue utilizado junto al marcador de la enzima riboflavin sintasa C en pruebas de PCR para identificar a especies patógenas de *Bartonella* que infectan a mascotas, así como animales silvestres (Fontalvo *et al.*, 2017). Otros también han probado este marcador exitosamente junto a otros, en roedores (Schulte *et al.*, 2016)

2.3.5 Gen de la proteína de choque térmico (*groEL*)

Debido a que algunas especies de *Bartonella* son transmitidas desde ectoparásitos a un hospedero mamífero (*B. henselae*, *B. quintana*, *B. vinsonii*, etc.), existe la necesidad de mecanismos de adaptación a factores de estrés, como por ejemplo la respuesta bacteriana al choque térmico, que resulta de una regulación muy fina en la síntesis de un grupo altamente conservado de proteínas que presumiblemente permiten a las bacterias patógenas adaptarse al estrés térmico y de otras formas en un hospedero mamífero. Esto fue aprovechado para enfocar la atención en uno de los componentes de esta respuesta, la familia de proteínas GroEL, la cual a su vez es uno de los principales antígenos de varias bacterias patógenas (Haake *et al.*, 1997). Algunas secuencias del gen *groEL* son utilizadas también para establecer diferencias entre miembros del género *Bartonella* (Zeaiter *et al.*, 2002). Esta

proteína es importante en la patogenia de *Bartonella bacilliformis*, ya que las lesiones vasculares, que representan una amenaza para la vida de las personas, ocurren por la confluencia de varios estímulos: los mitógenos derivados de la actividad bacteriana por células endoteliales, la inhibición de apoptosis por el patógeno, la producción de citoquinas, los factores de crecimiento presentes y la propia respuesta inflamatoria. La proteína GroEL, secretada por esta bacteria, es uno de estos factores y tiene la capacidad de alterar el crecimiento celular en cultivos *in vitro* (Smitherman y Minnick, 2005).

2.3.6 Gen de la invasina putativa de eritrocitos (*ialA-B*)

En la década de 1990, se describió a los genes A y B del locus asociado a invasión (*ialA-B*, *invasion-associated locus A and B*) de *Bartonella bacilliformis* como los responsables de conferir un fenotipo invasivo de eritrocitos por parte de *Escherichia coli* (Mitchell y Minnick, 1995), y posteriormente se estableció con claridad el rol que cumple la proteína IalB en el parasitismo de eritrocitos por *Bartonella* (Coleman y Minnick, 2001), convirtiéndose en un importante factor de virulencia. Desde entonces, este marcador también ha sido utilizado como blanco para la detección de especies de *Bartonella* (Dehio, 2004). En Perú se diseñó una PCR usando el gen *ialB* para identificar y diagnosticar cepas de *B. bacilliformis* (Padilla y Ventura, 2003a) y en el mismo año, este mismo grupo usó los métodos ERIC-PCR y REP-PCR para determinar genotipos de *Bartonella* (Padilla y Ventura, 2003b). También se han realizado extensos estudios moleculares de *Bartonella bacilliformis* que incluyen *ialA-B*, así como a *flaA*, *gyrA* y *parC* (Flores, 2008).

2.3.7 Gen de la adhesina de matriz extracelular (*pap31*)

Pap31 es una proteína dominante de unión a hemina que se presenta en *Bartonella* y que ha sido usada en varios trabajos para distinguir *B. henselae* de *B. quintana*, sobre todo en casos de la Enfermedad del Arañazo del Gato (Dabo *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2005). Esta proteína también se presenta en la cepa virulenta peruana de *Bartonella bacilliformis*. Es un antígeno importante, por lo cual se le ha usado en el pasado en ensayos tipo ELISA o inmunoblot (Taye *et al.*, 2005). También es un marcador muy útil en pruebas de PCR múltiple junto

con otros marcadores cuando se quiere diferenciar a *Bartonella* de *Rickettsia* (donde se usa el gen de la enzima citrato sintasa) y de miembros de Anaplasmataceae (géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Wolbachia*), donde se usa el gen del 16S-rRNA (Rolain *et al.*, 2003). Este marcador ha sido usado exitosamente en la detección de *Bartonella bacilliformis* (Angkasekwina *et al.*, 2014), empleando una técnica que amplifica el DNA tal como lo hace la PCR, pero ejerciendo para tal efecto una sola temperatura, la Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle o LAMP, por sus siglas en inglés (Garrido, 2016). Una prueba de ELISA que usó una proteína recombinante rPap31 en base a este gen fue utilizada con el objeto de determinar la seroprevalencia de *Bartonella bacilliformis* en los andes ecuatorianos (Lydy *et al.*, 2018).

2.3.8 Región Espaciadora Intergénica del 16S-23S RNA Ribosomal

La Región Espaciadora Intergénica (ITS, Figura 5) que presentan muchas bacterias y que separa los genes del 16S-23S es muy conocida por la gran variación de secuencia que presenta entre las distintas especies (Maggi *et al.*, 2005; Gurtler y Mayall, 1999). Por ello, esta región ha sido el blanco de detección en muchos protocolos PCR (Minnick y Anderson, 2006; Birtles *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 2000; Bergmans *et al.*, 1996; Roux y Raoult, 1995a; Minnick *et al.*, 1994). Este blanco ha sido usado exitosamente para realizar análisis filogenético, identificación y subtipificación de especies de *Bartonella*, entre ellas, *B. vinsonii* subespecie *arupensis*, *B. alsatica*, *B. tribocorum*, *B. koehlerae*, *B. quintana*, *B. blarridgeae*, *B. henselae* y *B. bacilliformis* (Houpikian y Raoult, 2001). *B. tribocorum* fue propuesta recién como especie nueva a finales de los años 1990 (Heller *et al.*, 1998). Se identificaron varias especies de *Bartonella* en rumiantes, basándose en la secuencia ITS (Maillard *et al.*, 2004b). Una prueba de PCR anidado (*nested* PCR) para la identificación de *B. henselae* y *B. clarridgeiae*, con una sensibilidad muy incrementada respecto a un PCR convencional fue diseñada a mediados de los años 2000 (Rampersad *et al.*, 2005). La detección a partir de vectores y reservorios también ha sido un blanco de búsqueda. Mediante PCR se detectaron e identificaron *B. quintana*, *B. elizabethae*, *B. koehlerae*, *B. doshiae*, *B. taylorii*, a partir de pulgas de roedores (Marié *et al.*, 2006). Varias especies de *Bartonella* fueron detectadas mediante un ensayo que combinaba la PCR (ITS del rRNA 16S-23S) con una técnica de

blotting (García-Esteban *et al.*, 2008). Un método para identificar DNA de *Bartonella* en garrapatas se desarrolló mediante la detección de esta región (Hercik *et al.*, 2007). En los Estados Unidos, dos pacientes femeninas presentaron una infección por *Bartonella*, bacteria que fue identificada en sangre y en base a las secuencias del espaciador interno 16S-23S y el gen de la enzima citrato sintasa, llegando a proponer una nueva especie, Candidatus *Bartonella melophagi* (Maggi *et al.*, 2009). Otros autores han logrado caracterizar molecularmente cepas de *Bartonella*, usando a este espaciador (Braga *et al.*, 2012).



Figura 5. Región Espaciadora Intergénica. Representación esquemática de la región que comprende a los genes de la subunidad 16S-rRNA, a los del 23S-rRNA y el espaciador intergénico que se halla entre ambos, que también es blanco de detección. Se detallan en el 16S-rRNA algunas variaciones que dependen de la especie de *Bartonella* (Adaptado y modificado de Bergmans *et al.*, 1996).

2.3.9 Gen de la enzima riboflavin sintasa (*ribC*)

Otro blanco importante suele ser el gen *ribC*. La ruta biosintética para la riboflavina (vitamina B2, el precursor de los cofactores esenciales flavín mononucleótido y flavín adenin dinucleótido) está presente en bacterias y plantas, pero ausente en vertebrados. Un fragmento del DNA bacteriano porta los genes *ribD*, *ribC*, y *ribE*, que codifican a homólogos de la enzima riboflavín deaminasa (RibD) y a las subunidades de la enzima riboflavin sintasa (RibC y RibE), respectivamente. Se condujo un análisis molecular de estos genes en una especie de *Bartonella* basándose en este marcador y utilizando precisamente un protocolo PCR y se propuso su utilidad para la diferenciación de *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. quintana*, y *B. bacilliformis* (Bereswill *et al.*, 1999). Posteriormente, el gen de la enzima riboflavin sintasa (*ribC*) se usó para la

identificación de *B. henselae*, *B. quintana*, *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, y *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, con una alta sensibilidad, con niveles de detección de hasta 10^{-4} ng (Johnson *et al.*, 2003). El marcador *ribC* fue propuesto como blanco de elección para diferenciar especies de *Bartonella* (Foucault *et al.*, 2006).

2.3.10 Gen de la subunidad beta de la polimerasa RNA (*rpoB*)

El gen *rpoB* es un blanco alternativo de detección y diferenciación que surgió cuando se encontró cierta heterogeneidad en las secuencias del 16S-rDNA (Viezens y Arvand, 2008; Dahllof *et al.*, 2000). Su potencia como marcador útil ha sido demostrada por LaScola (2003). También fue empleado para caracterizar a *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* genotipo III por PCR, usando el 16S-rRNA, la región ITS, y los genes *pap31*, *rpoB*, *gdh1* e *iaB* (Cadenas *et al.*, 2008). Hace poco tiempo, se usó a *rpoB* para detectar a *Bartonella* (una especie candidata nueva, *Candidatus Bartonella rodoniensis*) en triatominos (Laroche *et al.*, 2017). Por último, *rpoB* fue usado para detectar *Bartonella* en *Microtus*, con el propósito de determinar la diversidad genética y la prevalencia de este microorganismo en mamíferos (Tolkacz *et al.*, 2018).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPOTESIS

Una prueba PCR múltiple permitirá detectar e identificar, en un solo paso, en forma rápida, sensible y específica, a especies del género *Bartonella*, patógenas para el humano y será de utilidad como una prueba molecular diagnóstica y/o confirmativa.

3.2 OBJETIVO

3.2.1 Objetivo General

3.2.1.1 Desarrollar una PCR con marcadores múltiples (multiplex-PCR), que permita la detección y diferenciación en un solo ensayo de especies del género *Bartonella* causantes de enfermedad en humanos, en particular, *Bartonella bacilliformis*.

3.2.2 Objetivos específicos

3.2.2.1 Diseñar cebadores dirigidos a tres marcadores en la cepa a estudiar y probar su especificidad

3.2.2.2 Estandarizar una prueba de PCR convencional de cada marcador escogido para detección.

3.2.2.3 Estandarizar una prueba de PCR múltiple con los tres marcadores escogidos para detección.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

4.1.1 Cepa bacteriana de prueba

Se utilizó como cepa de prueba a *Bartonella bacilliformis* USM-LMM-003, obtenida a partir de un aislado clínico procedente de la ciudad de Cusco.

4.1.2 Cepa tipo

Se utilizó como cepa tipo a *Bartonella bacilliformis* CIP 57.17, obtenida de la Colección del Instituto Pasteur, y procedente de un aislado de 1957.

4.1.3 Cepas adicionales

Las cepas adicionales para las pruebas de PCR múltiple y convencional fueron cepas de laboratorio procedentes de aislados hospitalarios: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*.

4.2 Propagación de *Bartonella bacilliformis*

La propagación de la bacteria en estudio se realizó a partir de cultivo en medio bifásico constituido por una fase sólida de agar Columbia (AC) suplementado con sangre de cordero al 10% y una fase líquida de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI). Las colonias fueron cosechadas e inoculadas en placas de Agar Columbia suplementado con sangre de cordero al 10%. La incubación se hizo a 30°C en atmósfera con 5% de CO₂ y humedad saturada.

La Figura 6 muestra un esquema del protocolo seguido para este paso.

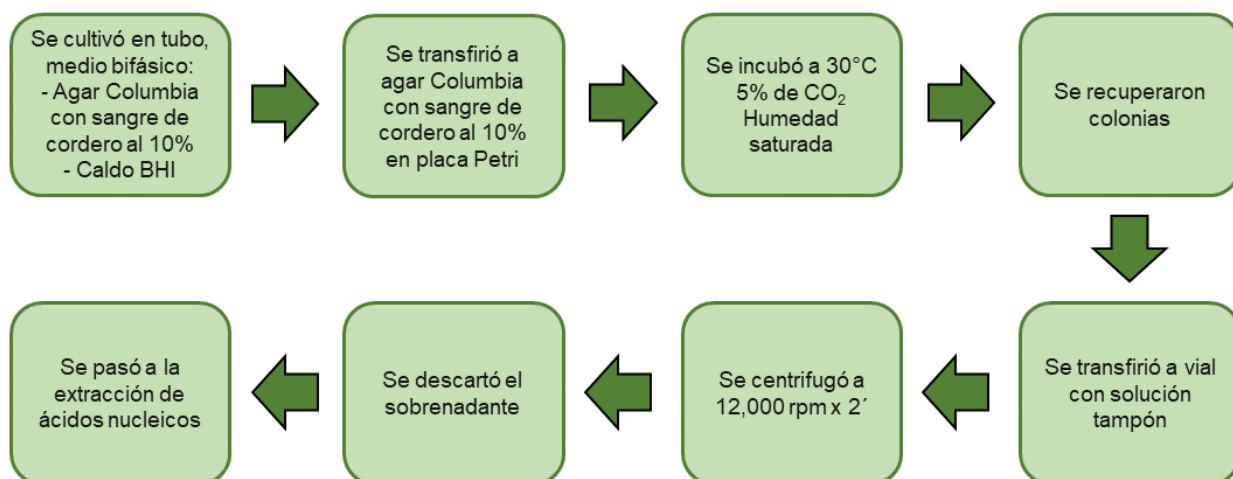


Figura 6. Esquema del protocolo seguido para el aislamiento y propagación de cepas de *Bartonella*.

4.3 Extracción de DNA del concentrado bacteriano

La extracción del DNA total bacteriano se realizó a partir de las células bacterianas cosechadas de los cultivos en placa, luego de 30 días de incubación. Se utilizó el *kit* de extracción BDtract™ Genomic DNA Isolation Kit (Maxim Biotech, Inc. 780 Dubuque Avenue, San Francisco, CA 94080, USA).

De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se procedió de acuerdo a lo que se muestra en la Figura 7.

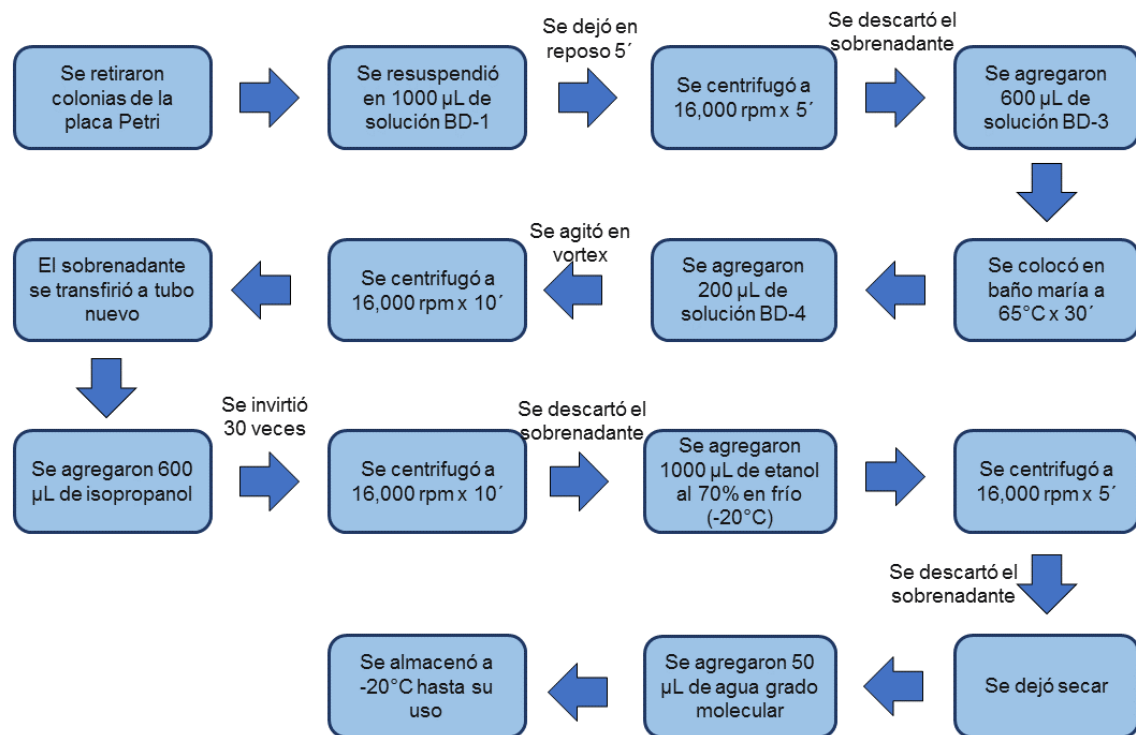


Figura 7. Esquema del protocolo seguido para la extracción del DNA del concentrado bacteriano.

4.4 Cuantificación del DNA

Se utilizó el equipo de cuantificación Qubit®, High Sensitive (HS) procediéndose de la forma que indica el fabricante y que se esquematiza en Anexos, Figura 18.

4.5 Diseño de cebadores

Los cebadores utilizados en este estudio se diseñaron para unirse a secuencias génicas de los siguientes marcadores: gen 16S-rRNA, Región Espaciadora Intergénica del 16S-23S rRNA (ITS) y gen *flaA*.

Para el diseño de los cebadores se tomaron en cuenta las propuestas de Johnson (2003), Cadenas (2008), Coleman (2001), Maillard (2004b), Sander (2000) y García-Esteban (2008).

Las secuencias génicas y genomas completos de las bacterias a estudiar se obtuvieron de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Las secuencias de los cebadores diseñados se modificaron y adaptaron al presente estudio mediante la aplicación de las herramientas bioinformáticas Bioedit Sequence Analysis Editor v7.0.0 ©1997-2007 Tom Hall (Hall, 1999), FastPCR Professional 6.1.47 beta 3 ©1999-2010 Ruslan Kalendar y ©2006-2010 PrimerDigital Ltd (Kalendar *et al.*, 2009) y ClustalX v2.0.10 ©2007 The European Bioinformatics Institute (Larkin, *et al.*, 2007). Las Figuras 15, 16 y 17 muestran la interfase de esos programas bioinformáticos.

El programa FastPCR, se utilizó para la predicción de cebadores a diseñar, insertando previamente el genoma de la bacteria a ensayar en formato FASTA. Luego se aplicó una de varias funciones: a) “Diseño de cebadores PCR”, para que proponga una lista de cebadores a tener en cuenta a partir del genoma insertado, b) “Prueba de cebadores”, para averiguar si la calidad del cebador era la correcta, si no se formaban dímeros, entre otros; c) “PCR *in silico*”, para llevar a cabo una PCR con los cebadores propuestos y obtener posibles productos.

El programa Bioedit, se usó para cargar los genomas y luego se incorporó cada cebador a probar. Como en la mayoría de los casos se contaba con la secuencia directa, a los cebadores se les aplicó la función “complemento reverso” para invertir el cebador antes del proceso y que se lleve a cabo un alineamiento efectivo, si había en el genoma un segmento similar.

En el caso del programa ClustalX, se utilizó para comparar las secuencias de los genes que se consideraron como blancos para detección en diferentes especies de *Bartonella*; estas secuencias génicas se evaluaron para diferencias y similitudes y en la medida de lo posible, se buscó que el cebador pudiera discernir entre el marcador buscado entre estas especies.

La síntesis de cebadores específicos para los marcadores referidos anteriormente se encargó a Invitrogen Corporation a través de una compañía nacional.

4.6 Estandarización de la prueba PCR convencional

Se realizaron pruebas de PCR con cebadores individuales (no múltiple) para los marcadores ITS, *flaA* y 16S-rRNA, frente a *B. bacilliformis* CIP 57.17 y un aislado clínico de *B. bacilliformis* USM-LMM-003.

La mezcla de reacción usada se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5
Mezcla de reacción utilizada para la PCR convencional

Reactivo	1X
Tampón 10X	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1 µL
dNTPs (10 mM)	1 µL
Cebadores (100 ng/µL)	1 µL
H ₂ O grado molecular	14,8
Taq 5U/µL	0,2 µL
DNA molde	4,5 µL
Volumen total	25 µL

Las condiciones de amplificación para la PCR múltiple se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6
Condiciones de amplificación para la PCR convencional

PASO	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 minutos	
Desnaturalización	95	30 segundos	30
Hibridización	60	30 segundos	
Extensión	72	2 minutos	
Extensión final	72	15 minutos	
Mantenimiento	4	∞	

4.7 Determinación de la especificidad de los cebadores

La especificidad de los cebadores diseñados para los marcadores ITS, *flaA* y 16S-rRNA, se probó frente a la cepa *B. bacilliformis* CIP 57.17 y un aislado clínico de *B. bacilliformis* USM-LMM-003) y a otras cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*.

De la misma forma, se realizó una PCR múltiple *in silico*, frente a genomas de cepas con las que no contamos en laboratorio, obtenidos a través de la herramienta bioinformática *In silico* PCR Amplification (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) (Bikandi *et al.*, 2004):

1. De la página principal de esta herramienta, se escogió el género a probar, p.e. *Bartonella*.
2. Se introdujo la serie de cebadores en formato FASTA.
3. Se escogió la especie bacteriana en particular a probar contra los cebadores.

4. Se establecieron las siguientes condiciones:
 - a. No apareamientos permitidos: 2
 - b. No apareamientos permitidos excepto en el último nucleótido en el extremo 3'.
5. Se amplificó en forma virtual.
6. Esto arrojó como resultados las supuestas bandas que amplificarían en la corrida electroforética.

El listado de las cepas probadas *in silico* se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7
Listado de cepas probadas *in silico*

Cepa	Número de acceso
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa C58 (Cereon)	NC_003062.2
<i>Bartonella bacilliformis</i> KC583	NC_008783.1
<i>Bartonella grahamii</i> as4aup	NC_012846.1
<i>Bartonella henselae</i> cepa Houston-1	NC_005956.1
<i>Bartonella quintana</i> cepa Toulouse	NC_005955.1
<i>Bartonella tribocorum</i> CIP 105476	NC_010160.1
<i>Bartonella clarridgeiae</i> 73	NC_014932.1
<i>Brucella melitensis</i> ATCC 23457	NC_012441.1
<i>Brucella melitensis</i> biovar Abortus 2308	NC_007618.1
<i>Brucella microti</i> CCM 4915	NC_013118.1
<i>Brucella ovis</i> ATCC 25840 cromosoma I	NC_009504.1
<i>Brucella ovis</i> ATCC 25840 cromosoma II	NC_009505.1
<i>Brucella suis</i> ATCC 23445 cromosoma I	NC_010167.1
<i>Brucella suis</i> ATCC 23445 cromosoma II	NC_010169.1
<i>Brucella abortus</i> S19 cromosoma I	NC_010740.1
<i>Brucella abortus</i> S19 cromosoma II	NC_010742.1
<i>Escherichia coli</i> K12 subcepa W3110	NC_007779.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B136-33	NC_002516.2

(<http://insilico.ehu.eus/PCR>)

4.8 Estandarización de la prueba PCR múltiple

Para el diseño de la prueba PCR múltiple y su estandarización se siguieron las recomendaciones de Delidow et al. (1993), Henegariu et al. (1997) y Elnifro et al. (2000).

La mezcla de reacción se detalla en la Tabla 8.

Tabla 8
Mezcla de reacción utilizada para la prueba PCR múltiple

Reactivo	1X
Tampón 10X	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	2 µL
dNTPs (10 mM)	1,5 µL
Cebadores (100 ng/µL, 0.5 µL c/u)	3 µL
H ₂ O grado molecular	10,8 µL
Taq 5U/µL	0,2 µL
DNA molde	5 µL
Volumen total	25 µL

Las condiciones de amplificación para la PCR múltiple se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9
Condiciones de amplificación para la PCR múltiple

PASO	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 minutos	
Desnaturalización	95	30 segundos	30
Hibridización	58	30 segundos	
Extensión	72	2 minutos	
Extensión final	72	15 minutos	
Mantenimiento	4	∞	

4.9 Detección de los productos de amplificación

- a. Los productos de amplificación de las pruebas individuales se detectaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% y en gel de agarosa al 2%. El marcador de tamaño molecular usado fue el Gene Ruler 100pb DNA Ladder (Fermentas).
- b. Los geles así procesados se tiñeron con Bromuro de Etidio (0.01%) y las bandas fueron visualizadas en transiluminador UV y se fotografiaron en un fotodocumentador Biometra.

5. RESULTADOS

5.1 Diseño de cebadores

El análisis bioinformático dio como resultado la producción de tres pares de cebadores específicos contra los tres marcadores escogidos para detectar *Bartonella bacilliformis*, como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10

Lista de cebadores con sus respectivas secuencias y blancos específicos en el genoma de *Bartonella*

Denominación	Secuencia	Gen
16S-Forward	5'-CCTTCAGTTMGGCTGGATC-3'	Gen 16S-rRNA
16S-Reverse	5'-GCCYCCTTGCGGTTAGCACA-3'	Gen 16S-rRNA
ITS-Forward	5'- AGATGATGATCCCAAGCCTTCTGG-3'	Región Espaciadora Intergénica del 16S-23S rRNA (ITS)
ITS-Reverse	5'- CTTCTCTTCACAATTTCAATAGA -3'	Región Espaciadora Intergénica del 16S-23S rRNA (ITS)
flaA-Forward	5'-ATAGAAAGAGCCTGAATACC-3'	Gen <i>flaA</i> (flagelina)
flaA-Reverse	5'-TGATGAAGCATGACAGTAACAC-3'	Gen <i>flaA</i> (flagelina)

5.2 PCR convencional *in vitro*

Las pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa individuales han dado como resultado que los cebadores diseñados en base las referencias mencionadas anteriormente, son específicos para secuencias de los tres marcadores escogidos: ITS, *flaA* y 16S-rRNA, frente a *Bartonella bacilliformis*, produciendo los amplicones del tamaño que se había previsto para esta bacteria mediante el análisis informático.

Los amplicones obtenidos de esta forma fueron evidenciados mediante corridas electroforéticas en gel de agarosa al 2% y posterior visualización y fotografía, como lo muestra la Figura 8. En esta prueba, los resultados que se observan corresponden a la cepa *Bartonella bacilliformis* CIP 57.17 de la Colección del Instituto Pasteur de Paris – Francia.

Los mismos amplicones obtenidos de los marcadores detectados, en forma individual (no múltiple), se demostraron por la formación de bandas en geles de poliacrilamida al 8%, como se muestra en las Figuras 9 y 10.

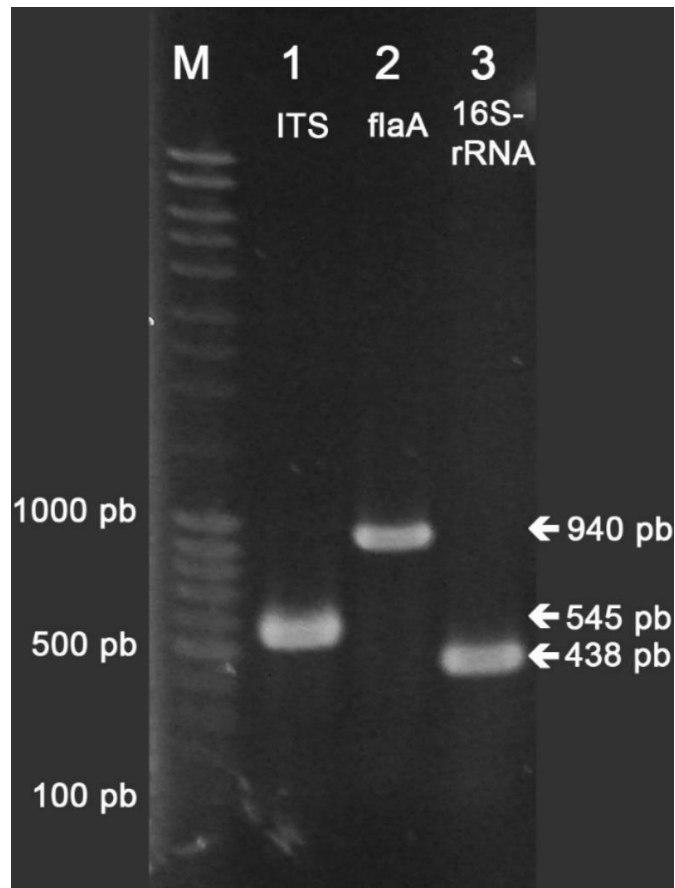


Figura 8. Amplificación por PCR de los marcadores ITS, *flaA* y 16S-rRNA a partir de DNA genómico de *Bartonella bacilliformis* CIP 57.17 de la Colección del Instituto Pasteur de Paris – Francia. M: marcador de tamaño molecular Gene Ruler 100pb DNA Ladder (Fermentas). 1, 2 y 3: amplicones ITS, *flaA* y 16S-rRNA, respectivamente.

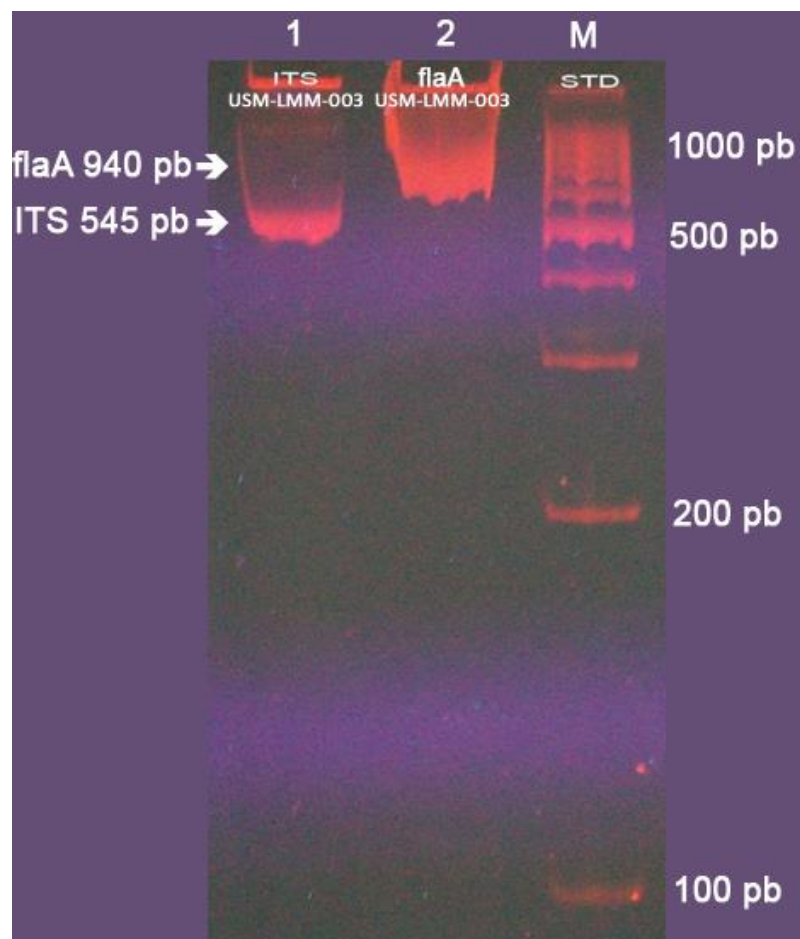


Figura 9. Amplificación por PCR de los marcadores ITS y *flaA* a partir de DNA genómico de un aislado clínico de *Bartonella bacilliformis* (USM-LMM-003). 1 y 2: Amplicones ITS y *flaA*, respectivamente. M: marcador de tamaño molecular Gene Ruler 100pb DNA Ladder (Fermentas).

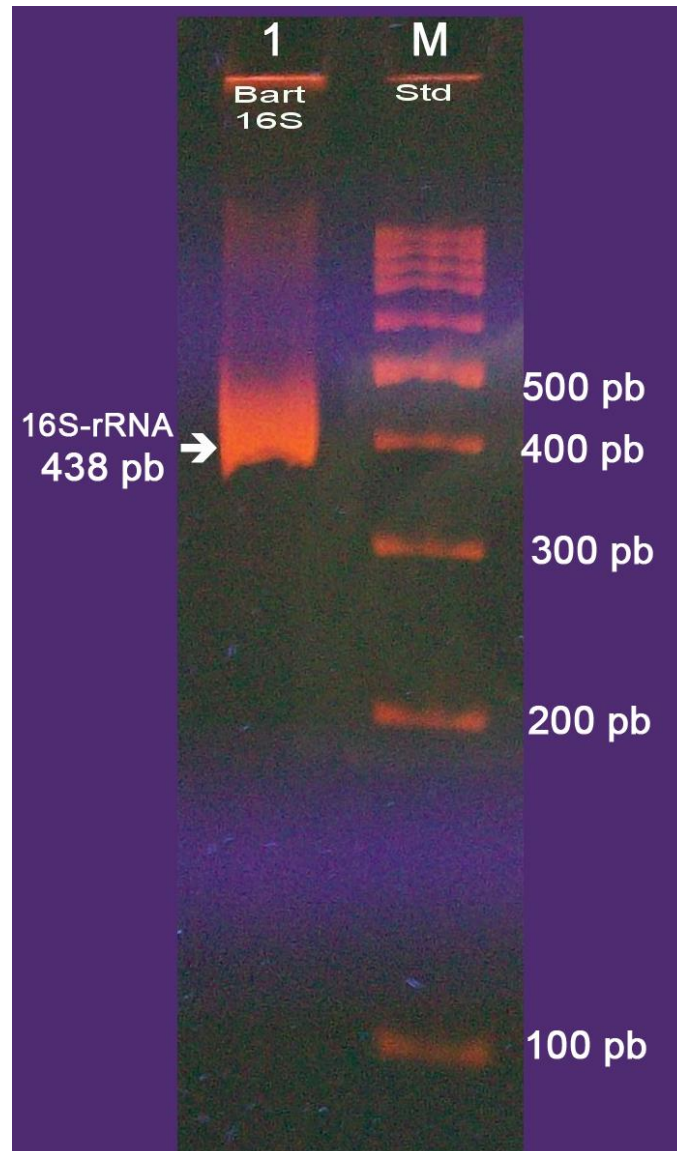


Figura 10. Amplificación por PCR del marcador 16S-rRNA a partir de DNA genómico de un aislado clínico de *Bartonella bacilliformis* (USM-LMM-003). 1: Amplicón 16S-rRNA. M: marcador de tamaño molecular Gene Ruler 100pb DNA Ladder (Fermentas).

Los ensayos de PCR convencional (no múltiple) con dichos cebadores individuales realizados utilizando como blancos de detección a cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*, no produjeron amplicones y, por lo tanto, no se presentaron bandas en los carriles donde fueron colocadas muestras de estas cepas, como se puede observar en la Figura 11.

5.3 Especificidad de los cebadores

5.3.1 Determinación de la especificidad *in vitro*

Se confirmó la especificidad de los cebadores diseñados al comparar los resultados electroforéticos del marcador *flaA*, que codifica para la flagelina en la cepa bajo estudio, contra otras bacterias flageladas, como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, que también presentan flagelo, pero que dieron resultado negativo, como se muestra en la Figura 11.

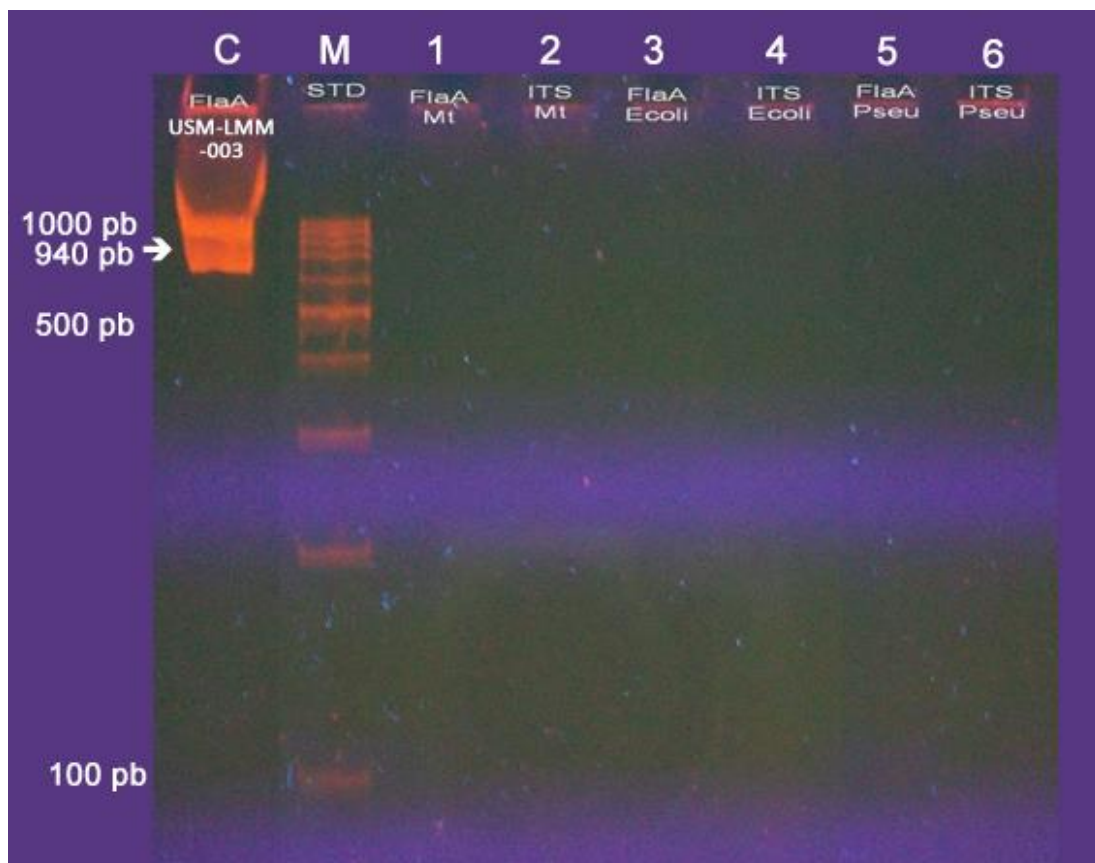


Figura 11. Amplificación por PCR de los marcadores *flaA* e ITS a partir de DNA genómico de *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, de origen hospitalario. C: Control + Amplicón *flaA* de *B. bacilliformis*. M: Marcador de tamaño molecular Gene Ruler 100pb DNA Ladder (Fermentas). 1 y 2: prueba de los cebadores *flaA* e ITS respectivamente, contra *Mycobacterium tuberculosis*. 3 y 4: prueba de los cebadores *flaA* e ITS respectivamente, contra *Escherichia coli*. 5 y 6: prueba de los cebadores *flaA* e ITS respectivamente, contra *Pseudomonas aeruginosa*.

5.3.2 Determinación de la especificidad *in silico*

Los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa fueron realizados en forma virtual (*in silico*), mediante la herramienta informática *In silico* PCR Amplification (<http://insilico.ehu.es/PCR/>), utilizando cebadores para 16S-rRNA, ITS y *flaA*, frente a los genomas de varias cepas bacterianas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11 y en la Figura 12.

La cepa *Bartonella bacilliformis* KC583 presenta un patrón de bandas a 940, 545 y 438 pares de bases, que con el marcador de peso molecular estándar usado, se diferencia de las otras cepas de *Bartonella* probadas. *Escherichia coli* K12, *Agrobacterium tumefaciens* C58 y *Pseudomonas aeruginosa* no presentaron bandas, lo cual permite diferenciar claramente a *B. bacilliformis*.

Tabla 11

Resultados de la PCR *in silico* usando tres marcadores para detectar *Bartonella*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas aeruginosa*

Cepa	Presenta amplicón para el marcador	Tamaño de banda (pb)
<i>Bartonella bacilliformis</i> KC583	16S-rRNA ITS <i>flaA</i>	438 545 940
<i>Bartonella grahamii</i> as4aup	16S-rRNA ITS	438 715
<i>Bartonella henselae</i> cepa Houston-1	16S-rRNA ITS	438 715
<i>Bartonella quintana</i> cepa Toulouse	16S-rRNA ITS	438 621
<i>Bartonella clarridgeiae</i> 73	16S-rRNA <i>flaA</i>	438 997
<i>Bartonella tribocorum</i> CIP105476	16S-rRNA ITS	438 762
<i>Escherichia coli</i> k12 subcepa W3110	-	Sin bandas
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa C58	-	Sin bandas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Sin bandas

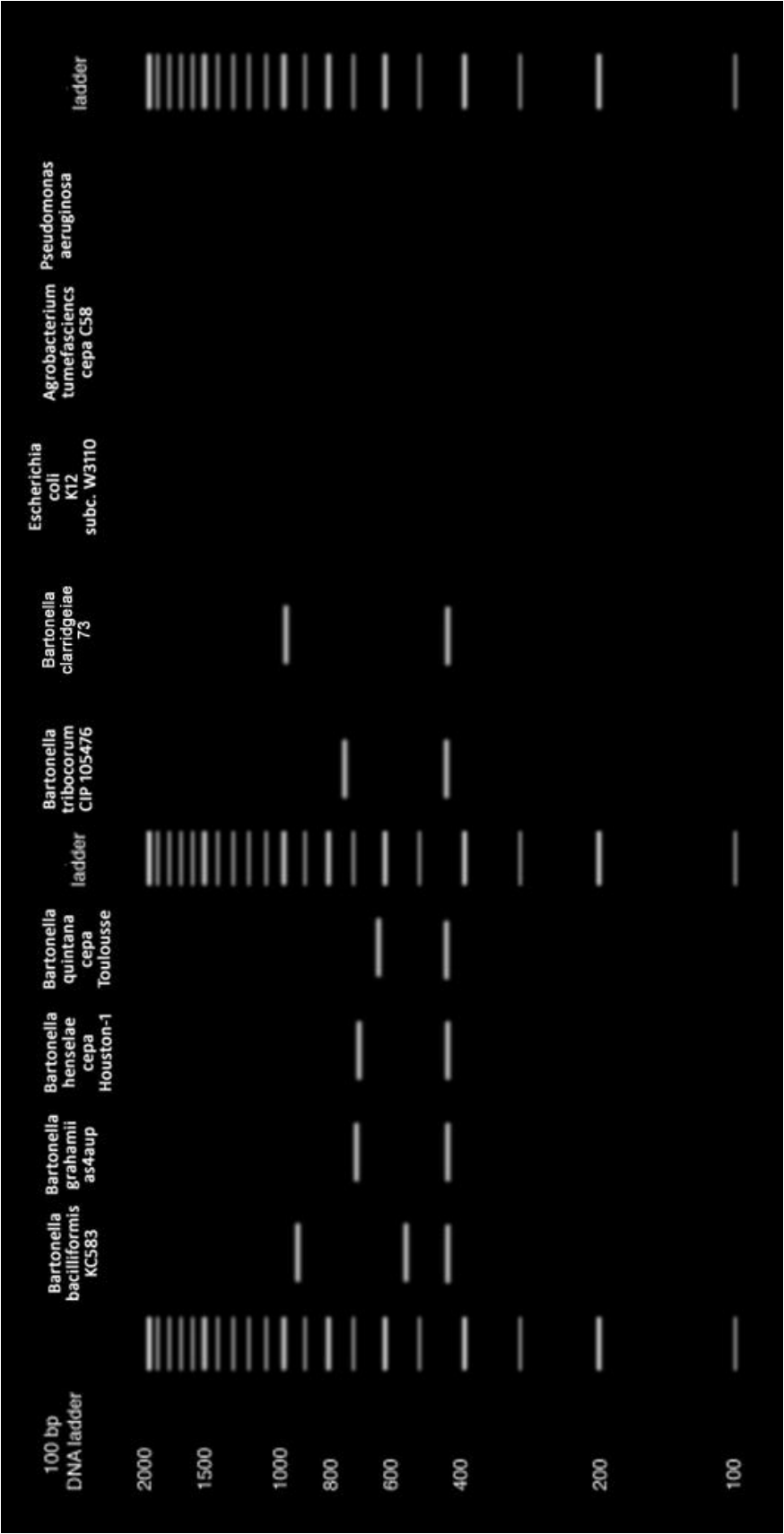


Figura 12. Resultados de la PCR *in silico* usando los cebadores diseñados contra varias cepas de *Bartonella* y otras cepas, indicadas en la Tabla 11.

La PCR *in silico* adicional, en la que se usaron los cebadores diseñados contra el genoma completo de varias cepas relacionadas.

La cepa *Bartonella bacilliformis* KC583 presenta un patrón de bandas a 940, 545 y 438 pares de bases, mientras que diferentes cepas de *Brucella* presentaron un patrón de bandas diferente, permitiendo la identificación precisa de *Bartonella bacilliformis*.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12 y en la Figura 13.

Tabla 12

Resultados de la PCR *in silico* usando tres marcadores para detectar *Bartonella bacilliformis* y varias especies de *Brucella*

Cepa	Presenta amplicón para el marcador	Pares de bases
<i>Bartonella bacilliformis</i> KC583	16S-rRNA	438
	ITS	545
	<i>flaA</i>	940
<i>Brucella melitensis</i> ATCC 23457	16S-rRNA	438
<i>Brucella melitensis</i> biovar Abortus 2308	16S-rRNA	438
<i>Brucella microti</i> ccm 4915	16S-rRNA	438
	ITS	715
<i>Brucella ovis</i> ATCC 25840 cromosoma I	16S-rRNA	438
<i>Brucella suis</i> ATCC 23445	16S-rRNA	438
<i>Brucella abortus</i> S19	16S-rRNA	438

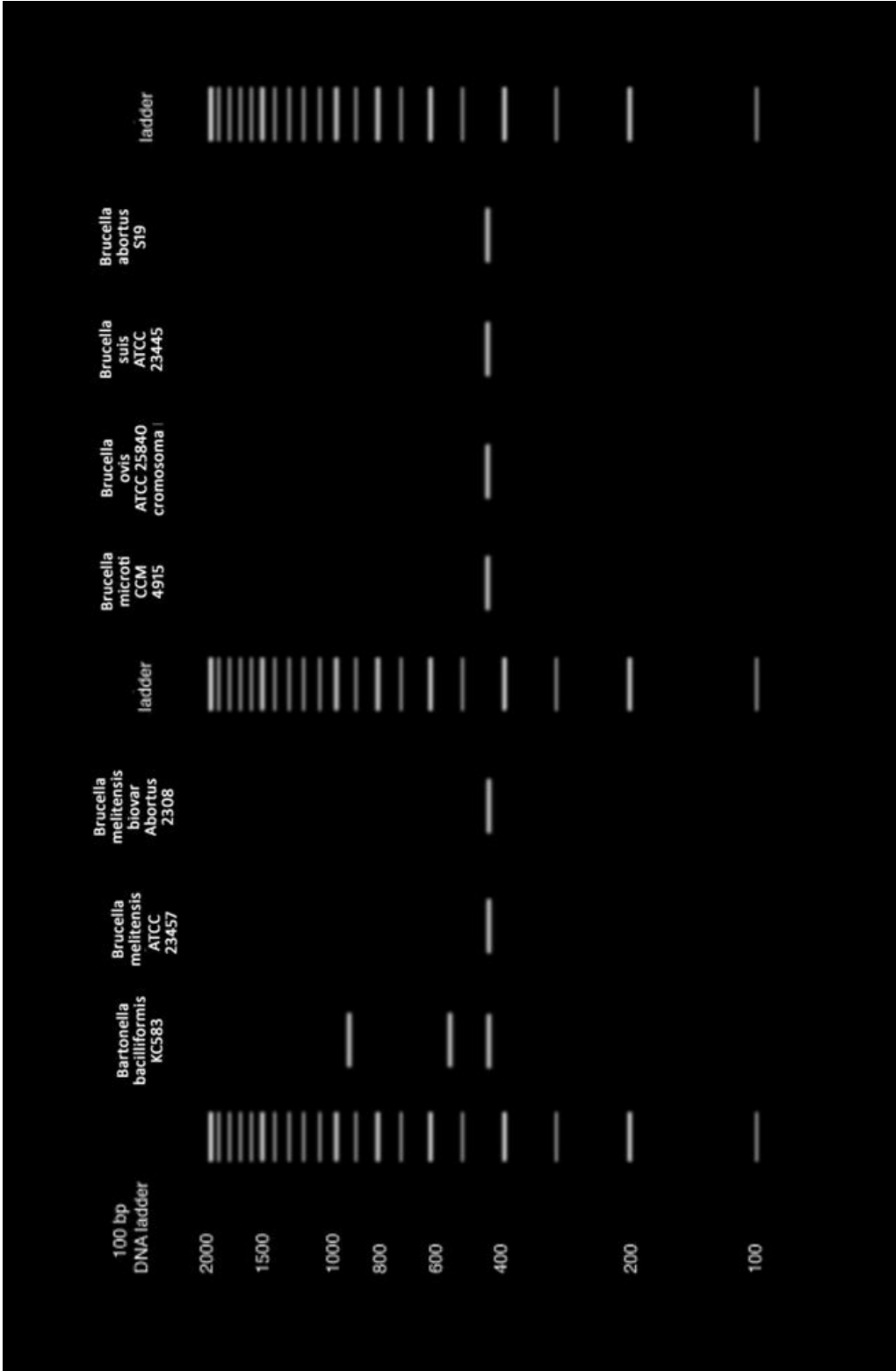


Figura 13. Resultados de la PCR *in silico* usando los cebadores diseñados contra *Bartonella bacilliformis* KC583 y otras cepas, indicadas en la Tabla 12.

5.4 PCR múltiple *in vitro*

El desarrollo de la prueba PCR múltiple para la detección e identificación de *Bartonella* ha dado como resultado la producción de perfiles de bandas de amplificación diferenciados (3 bandas), de acuerdo a los 3 marcadores utilizados:

- Una banda de 438 pb, correspondiente al marcador 16S-rRNA, común a todas las bacterias del género *Bartonella*, con el mismo tamaño en todas ellas (control del género *Bartonella*, Figura 14).
- Una banda de 940 pb, correspondiente al marcador Flagelina (*flaA*), presente en *Bartonella bacilliformis* (Figura 14). Este marcador también se encuentra en *Bartonella clarridgeiae*, especie que no hemos usado en este estudio, cuyo análisis predice un amplicón de 997 pb.
- Una banda de 545 pb (para el caso de *Bartonella bacilliformis*), correspondiente al marcador de la Región Espaciadora Intergénica (ITS) (Figura 14). El tamaño de esta región es variable en diferentes especies del género *Bartonella*.

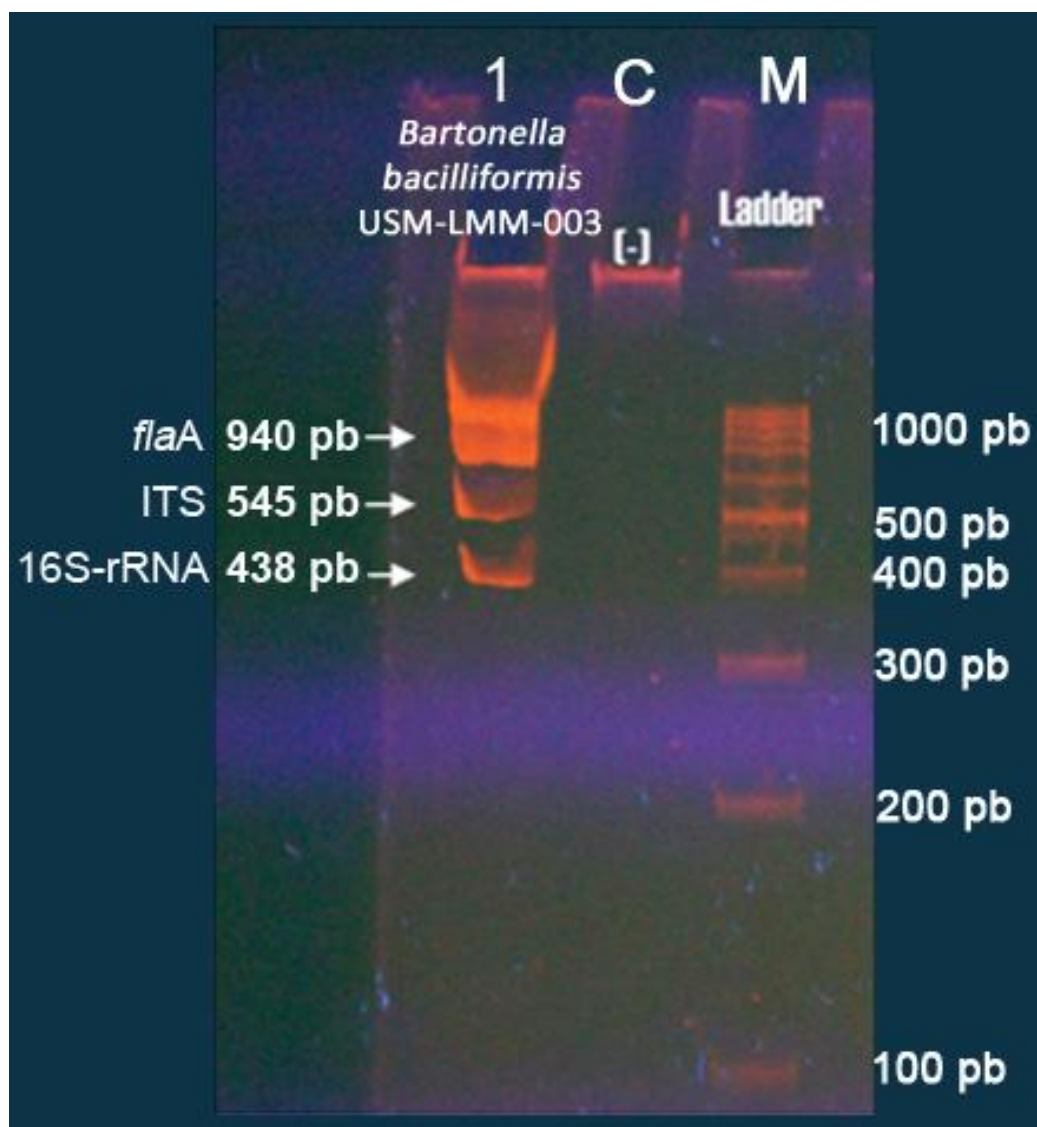


Figura 14. Amplificación por PCR múltiple a partir del DNA genómico de un aislado clínico de *Bartonella bacilliformis* (USM-LMM-003) usando los marcadores ITS, *flaA* y 16S-rRNA. 1: Amplicones *flaA*, ITS y 16S-rRNA, con los tamaños esperados de 940 pb, 545 pb y 438 pb, respectivamente. C: Control negativo. M: Marcador de tamaño molecular Gene Ruler 100pb DNA Ladder (Fermentas).

6. DISCUSIÓN

En el Perú la detección e identificación de *Bartonella*, específicamente *B. bacilliformis*, es un proceso largo y tedioso. Esta bacteria representa un serio problema de salud para los pobladores de la región andina, lo que justifica el diseño de una prueba rápida, eficaz y muy específica (Maguiña, 2008; Pachas, 2001; Anderson y Neuman, 1995). Además, debido a que el género *Bartonella* está conformado por microorganismos nutricionalmente exigentes, se convierte en un candidato idóneo para la detección por cualquier método basado en la PCR (Johnson *et al.*, 2003).

En tal sentido, la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) es una técnica que por ser sensible y cada vez más asequible, permite la detección de material genético procedente de bacterias patógenas, aun cuando se hallen en muy poca concentración en fluidos o tejidos, inclusive capaz de detectar una sola copia de DNA en la muestra. Además, los costos de los equipos e insumos han ido disminuyendo paulatinamente con el uso extendido de esta técnica, poniéndola al alcance de cada vez más laboratorios, sea cual sea su envergadura. Por eso, cada vez se amplía más su uso en el diagnóstico de enfermedades infecciosas en nuestro medio.

En el caso de *Bartonella*, se han desarrollado varias pruebas de diferente tipo, utilizando diferentes marcadores, como por ejemplo el gen *ribC*, que codifica para la proteína riboflavin sintasa (Bereswill *et al.*, 1999), el gen de la subunidad 16S-rRNA, el gen *ftsZ*, que codifica a una proteína de la división celular; PCR anidado (Kelly *et al.*, 1998), el gen *groEL* (proteína de choque térmico) (Zeaiter *et al.* 2002; Lee y Falkow, 1998), el gen *gltA*, que codifica para la citrato sintasa (Chung *et al.*, 2005), el gen *ialB*, que codifica para una proteína de invasión (Xu y Chai, 2002), el gen *flaA*, que codifica para la proteína flagelina (Sander *et al.*, 2000) y también la Región Espaciadora Intergénica que se halla entre los genes 16S y 23S, muy conservada entre bacterias. Todas estas pruebas han demostrado ser útiles para la detección de *Bartonella*.

En el caso del presente estudio, el 16S-rRNA es muy útil puesto que está muy conservado entre especies bacterianas (Case *et al.*, 2007). El porcentaje de similitud en secuencia es muy alto (99,7%) entre bartonelas. De buscarlo y hallarlo, podemos tener casi la certeza de estar frente a una cepa del género

Bartonella. Sin embargo, presenta similitud con secuencias en *Brucella* (94%) y aunque algo más baja, permite teóricamente la diferenciación dependiendo de la metodología empleada (La Scola *et al.*, 2003).

Al llevar a cabo la prueba de PCR *in silico* en este estudio, esta diferencia no existía, puesto que predecía bandas de 438 pb tanto para *Brucella* como para *Bartonella* (Figura 13), lo cual sugiere la necesidad de más pruebas contra más cepas y en particular, usar este marcador junto con otros. Los cebadores diseñados en este estudio producen un amplicón de 438 pb común a todas las bacterias del género *Bartonella* (control del género *Bartonella*).

Bartonella bacilliformis es una bacteria altamente móvil debido a un penacho de flagelos unipolares (Scherer *et al.*, 1993; Krueger, 1995). El componente principal, flagelina, es una proteína codificada por el gen *flaA* y está presente en *Bartonella bacilliformis* y en *Bartonella clarridgeiae*, mas no así en otras especies importantes, como *Bartonella henselae*, *B. quintana* y *B. tribocorum*, aun cuando estas últimas estén en capacidad de invadir eritrocitos (el flagelo se considera un factor de patogenicidad importante para la adherencia de la bacteria e invasión de eritrocitos) (Dehio, 2004). *B. clarridgeiae* ha sido reportada como patógeno emergente por zoonosis, aunque para ella el flagelo juega un rol similar al caso de *B. bacilliformis* (Whitney *et al.*, 2009) Ambas cepas producen amplicones de diferente tamaño para este marcador, 940 y 997 pb, respectivamente, lo que indica su estrecha similitud, probada en otros estudios (Sander *et al.*, 2000). Sin embargo, en el caso de *B. clarridgeiae* la región ITS es distinta a la de *B. bacilliformis*, lo hace que el marcador para flagelina pueda ser utilizado en este ensayo para diferenciar *B. bacilliformis* de otras bartonelas en una prueba múltiple.

El valor de los cebadores dirigidos a la detección de flagelina de *Bartonella bacilliformis* se hace evidente al comparar los productos que se generan en la PCR *in vitro* para esta bacteria frente a los de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, ambas formadoras de flagelo, en el primer caso peritrico y en el segundo unipolar. El cebador diseñado en esta prueba genera una banda para flagelina de 940 pb, mientras que no lo hace para las dos otras bacterias Gramnegativas mencionadas, es decir, logra diferenciarla ya que presentan flagelina con suficientes diferencias.

La Región Espaciadora Intergénica (ITS) corresponde a un espacio de RNA no funcional entre los genes de la región 16S-23S-rRNA. Secuenciado por Roux y Raoult (1995b), es considerado por varios investigadores como una alternativa útil cuando se trata de diferenciar especies bacterianas indistinguibles si se analiza solamente el gen del 16S-rRNA (Clarridge, 2004; Parola *et al.*, 2002). Esto debido a que ITS es una región hipervariable, lo cual ya ha sido demostrado para el caso de *Bartonella*, con un alto grado de variabilidad interespecies (Houpikian y Raoult, 2001; Birtles *et al.*, 2000; Minnick *et al.*, 1994). En el caso de este estudio, las pruebas *in silico* muestran variaciones en cuanto al tamaño del amplicón para ITS entre las distintas bartonelas probadas, sugiriendo que es un buen candidato para una identificación precisa, lo que permite diferenciar entre las distintas especies de este género.

De los marcadores escogidos, 16S-rRNA, *flaA* e ITS, estudios previos afirman que el 16S-rRNA tiene el más bajo umbral de detección, aunque esto tiene interés a nivel clínico, ya que se presenta en individuos en estado febril (Gomes *et al.*, 2016). La presente propuesta no solo considera a este marcador, sino que el verdadero peso de la prueba estriba en ser de naturaleza múltiple.

Existen algunos ensayos de PCR múltiple que involucran la búsqueda de la Proteína de Choque Térmico (HSP), ITS y *ftsZ*, marcadores que han mostrado utilidad en la detección de *Bartonella henselae*, no así en el caso de *Bartonella bacilliformis* (Kawasato *et al.*, 2013). Nuevamente aparece ITS como uno de los blancos de búsqueda, ya que permite una buena diferenciación con otras bartonelas.

Lo más cercano al PCR múltiple propuesto se encuentra en una prueba llamada PCR-RLB (PCR-Reverse Line Blotting) por los blancos que incluye, las secuencias de ITS y al 16S-rRNA, es decir, es una PCR múltiple, siguiendo a ella un proceso de transferencia de productos de la PCR a membranas (*blotting*), lo que en la perspectiva de búsqueda de una prueba lo más simplificada posible, la hace más vulnerable, prolongada y además costosa, aunque es necesario reconocer que se ha probado su especificidad y sensibilidad en la diferenciación de cerca de 20 especies de *Bartonella* y hace unos años se encontraba en proceso de obtención de patente (García-Esteban *et al.*, 2008). Sin embargo, no considera al marcador *flaA*, que es también importante, ya que la presencia de flagelos está restringida en bartonelas a *B. bacilliformis* y *B. clarridgeiae*. Aunque

la importancia clínica de *B. clarridgeiae* radica en que es un patógeno emergente en Perú, ya que está asociado a la enfermedad del arañazo del gato, bajo los parámetros del presente estudio, es diferenciable de *B. bacilliformis* puesto que los cebadores diseñados para detectar el marcador ITS no generan productos en los ensayos *in silico* en el presente estudio y que sería objeto de prueba a partir de aislados de pacientes con esta zoonosis.

Otra modalidad de PCR múltiple que ha tenido éxito es llevando a cabo el ensayo en tiempo real. Esta modalidad supone una ventaja al brindar información sobre cuantificación en tiempo real, pero en este caso, ese detalle pasa a segundo plano, ya que, si bien otorga una muy buena sensibilidad, también hace más complejo el proceso y la infraestructura necesaria. Lo que más se ha probado es usar cebadores que busquen ITS y *pap31* en *Bartonella henselae* (Jones, S. *et al.*, 2008). No se ha hallado evidencia de desarrollo de una prueba PCR múltiple en tiempo real para el caso de *Bartonella bacilliformis* en nuestro medio, menos aún con tres marcadores.

Diez años atrás en nuestro medio solo había una bartonela clínicamente importante como problema de salud pública, *Bartonella bacilliformis*. Los cambios ambientales progresivos, como el calentamiento global, están generando a su vez variaciones en la distribución de vectores y las bartonelas los usan. Además de ello, se puede esperar que ocurran cambios en costumbres sociales, en interacción con mascotas, y a otros niveles, lo que modifica las probabilidades de expansión de patógenos como las bartonelas. Un ejemplo de ello es *Bartonella clarridgeiae*, que se considera actualmente un patógeno emergente en Perú al haberse presentado casos de la zoonosis conocida como la Enfermedad por el Arañazo del Gato (EAG), que clásicamente ha tenido origen etiológico en *Bartonella henselae*, presente en Perú, pero que también se ha demostrado como originada por *Bartonella clarridgeiae* (Huarcaya *et al.*, 2002; Polanco *et al.*, 2008). Ello, en principio, representaría un problema para la detección por la prueba propuesta en este estudio, ya que tanto *B. bacilliformis* como *B. clarridgeiae* presentan una flagelina muy similar (940 y 997 pb, respectivamente, además presentar el marcador 16S-rRNA virtualmente idéntico (438 pb). Sin embargo, entre los cebadores diseñados en este trabajo se halla ITS, para el cual *B. bacilliformis* presenta una banda de 545 pb cuando se llevan a cabo las pruebas *in vitro*, pero que en el caso de *B. clarridgeiae* no la presenta

cuando se realizaron las pruebas *in silico* (al no contar con una cepa de *B. clarridgeiae* que pudiera probarse *in vitro*). Esta ausencia se debe muy probablemente a que ITS es una región hipervariable y diferenciable gracias al diseño del cebador. De tal forma que, si bien es cierto ambas especies comparten productos similares para los marcadores *flaA* y 16S-rRNA en la PCR *in silico*, la ausencia de producto para ITS en el caso de *B. clarridgeiae* hace que esta prueba de PCR múltiple las haga claramente distinguibles.

Debemos tener en cuenta también que el ensayo propuesto con los marcadores escogidos tiene un valor agregado, que es el de poder discernir la presencia de *Bartonella* con el de otras bacterias que, a pesar de afectar solamente a animales, se encuentran muy estrechamente emparentadas, como por ejemplo *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Brucella microti* y *Brucella suis*. De una afección veterinaria a una zoonosis hay muy poco margen.

Uno de los puntos más críticos en el desarrollo de un ensayo de PCR múltiple es el número de marcadores que se desean detectar, lo que incrementa a su vez el uso de cebadores y al mismo tiempo aumenta las dificultades al momento de evaluar las mejores condiciones para la PCR y que los amplicones sean obtenidos de forma que se puedan evidenciar mediante la electroforesis, sea en geles de agarosa o de poliacrilamida. En este trabajo se considera que tres marcadores son más que suficientes para hacer una distinción entre las cepas que pudieran preocupar a las autoridades de salud a la hora de evaluar la presencia de las diferentes bartonelas que pueden atacar a la población de nuestra región.

La estandarización de la prueba PCR múltiple está dando resultados positivos bajo las condiciones empleadas en este estudio. Las condiciones elegidas para la amplificación de los segmentos génicos detectados han mostrado la eficiencia de la prueba frente a las muestras, sobre todo para identificar a *Bartonella bacilliformis*.

El patrón electroforético observado en la PCR múltiple indica que la prueba fue útil para detectar a *Bartonella bacilliformis* y gracias a la información obtenida de las pruebas *in silico*, podría estar en capacidad de diferenciarla de otras bartonelas y bacterias filogenéticamente relacionadas a nivel clínico.

7. CONCLUSIONES

- 7.1 Se logró diseñar tres pares de cebadores para amplificar los marcadores: 1) Región Espaciadora Intergénica ITS, que separa los genes 16S-23S rRNA; 2) gen *flaA*, que codifica para la proteína flagelina en *Bartonella*, y 3) gen 16S-rRNA, altamente conservado entre las especies de *Bartonella*.
- 7.2 Los cebadores diseñados son específicos para la detección e identificación de *Bartonella bacilliformis* cuando se usan simultáneamente, tanto *in vitro* como *in silico*.
- 7.3 La prueba de PCR múltiple desarrollada en este estudio, utilizando los cebadores antes mencionados, fue útil para la detección e identificación confirmativa de *Bartonella bacilliformis* en un solo ensayo.
- 7.4 La prueba de PCR múltiple fue útil para diferenciar *in silico* a la bacteria *Bartonella bacilliformis* de otras especies del género y de bacterias filogenéticamente relacionadas.

8. RECOMENDACIONES

- 8.1 Probar el PCR múltiple mencionado con más especies de *Bartonella* a fin de ampliar su utilidad para detectar e identificar a los agentes etiológicos de la bartonelosis humana y especialmente al de la Enfermedad de Carrión, con alta especificidad.
- 8.2 Probar esta metodología contra cepas filogenéticamente relacionadas, como *Brucella*, con el objeto de averiguar si estos cebadores son útiles para diferenciar a estos géneros bacterianos.
- 8.3 Probar esta metodología contra muestras de sangre total de pacientes enfermos y sanos para evaluar la utilidad de la prueba en el campo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9.1 Artículos en revistas / Tesis académicas

1. ANDERSON, B.; SIMS, K.; REGNERY, R.; ROBINSON, L.; SCHMIDT, M.J.; GORAL, S.; HAGER, C.; EDWARDS, K. 1994. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 32, no. 4, pp. 942-948. ISSN 00951137.
2. ANDERSON, B.E.; NEUMAN, M.A. 1997. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 10, no. 2, pp. 203-219. ISSN 08938512.
3. ANGKASEKWINAI, N.; ATKINS, E.H.; JOHNSON, R.N.; GRIECO, J.P.; CHING, W.M.; CHAO, C.C. 2014. Rapid and Sensitive Detection of *Bartonella bacilliformis* in Experimentally Infected Sand Flies by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of the *Pap31* Gene. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 8, no. 12, pp. e3342. ISSN 19352735. DOI 10.1371/journal.pntd.0003342.
4. ARVAND, M.; SCHÄD, S.G. 2006. Isolation of *Bartonella henselae* DNA from the peripheral blood of a patient with cat scratch disease up to 4 months after the cat scratch injury. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 6, pp. 2288-2290. ISSN 00951137. DOI 10.1128/JCM.00239-06.
5. ARVAND, M.; VIEZENS, J.; BERGHOFF, J. 2008. Prolonged *Bartonella henselae* bacteremia caused by reinfection in cats. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 14, no. 1, pp. 152-154. ISSN 10806059. DOI 10.3201/eid1401.070768.
6. BATTISTI, J.M.; MINNICK, M.F. 1999. Development of a system for genetic manipulation of *Bartonella bacilliformis*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 54, no. 2, pp. 347-353. ISSN 00992240.
7. BENSON, L.A.; KAR, S.; MCLAUGHLIN, G.; IHLER, G.M. 1986. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infection and Immunity*, vol. 54, no. 2, pp. 347-353. ISSN 00199567.
8. BERESWILL, S.; HINKELMANN, S.; KIST, M.; SANDER, A. 1999. Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the *ribC* gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 37, no. 10, pp. 3159-3166. ISSN 00951137.

9. BERGHOFF, J.; VIEZENS, J.; GUPTILL, L.; FABBI, M.; ARVARD, M. 2007. *Bartonella henselae* exists as a mosaic of different genetic variants in the infected host. *Microbiology*, vol. 153, pp. 2045-2051. ISSN 13500872. DOI 10.1099/mic.0.2007/006379-0.
10. BERGMANS, A.M.C.; SCHELLEKENS, J.F.P.; VAN EMBDEN, J.D.A.; SCHOOLS, L.M. 1996. Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in The Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 34, no. 2, pp. 254-260. ISSN 00951137.
11. BERMOND, D.; HELLER, R.; BARRAT, F.; DELACOUR, G.; DEHIO, C.; ALLIOT, A.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.; BOULOUIS, H.J.; PIÉMONT, Y. 2000. *Bartonella birtlesii* sp. nov.; isolated from small mammals (*Apodemus* spp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 50, pp. 1973-1979. ISSN 14665026. DOI 10.1099/00207713-50-6-1973.
12. BERMOND, D.; BOULOUIS, H.J.; HELLER, R.; VAN LAERE, G.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.B.; SANDER, A.; DEHIO, C.; PIÉMONT, Y. 2002. *Bartonella bovis* Bermond et al. sp. nov. and *Bartonella capreoli* sp. nov.; isolated from European ruminants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 52, pp. 383-390. ISSN 14665026. DOI 10.1099/00207713-52-2-383.
13. BIKANDI, J.; MILLÁN, R.S.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. 2004. *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics*, vol. 20, no. 5, pp. 798-799. ISSN 13674803. DOI 10.1093/bioinformatics/btg491.
14. BIRTLES, R.J.; RAOULT, D. 1996. Comparison of Partial Citrate Synthase Gene (gltA) Sequences for Phylogenetic Analysis of *Bartonella* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 46, no. 4, pp. 891-897. ISSN 0020-7713. DOI 10.1099/00207713-46-4-891.
15. BIRTLES, R.J.; CANALES, J.; VENTOSILLA, P.; ALVAREZ, E.; GUERRA, H.; LLANOS-CUENTAS, A.; RAOULT, D.; DOSHI, N.; HARRISON, T.G. 1999. Survey of *Bartonella* species infecting intradomicillary animals in the Huayllacallan Valley, Ancash, Peru, a region endemic for human bartonellosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 60, no. 5, pp. 799-805. ISSN 00029637. DOI 10.4269/ajtmh.1999.60.799.

16. BIRTLES, R.J.; HAZEL, S.; BOWN, K.; RAOULT, D.; BEGON, M.; BENNETT, M. 2000. Subtyping of uncultured *Bartonellae* using sequence comparison of 16 S/23 S rRNA intergenic spacer regions amplified directly from infected blood. *Mol Cell Probes*, vol. 14, no. 2, pp. 79-87. DOI 10.1006/mcpr.2000.0289.
17. BIRTLES, R.J.; FRY, N.K.; VENTOSILLA, P.; CÁCERES, A.G.; SÁNCHEZ, E.; VIZCARRA, H.; RAOULT, D. 2002. Identification of *Bartonella bacilliformis* genotypes and their relevance to epidemiological investigations of human bartonellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, no. 10, pp. 3606-3612. ISSN 00951137. DOI 10.1128/JCM.40.10.3606-3612.2002.
18. BIRTLES, R.J.; HARRISON, T.G.; SAUNDERS, N.A.; MOLYNEUX, D.H. 2009. Proposals To Unify the Genera *Grahamella* and *Bartonella*, with Descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov.; *Bartonella peromysci* comb. nov.; and Three New Species, *Bartonella grahamii* sp. nov.; *Bartonella taylorii* sp. nov.; and *Bartonella doshiae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 45, pp. 1-8. ISSN 0020-7713. DOI 10.1099/00207713-45-1-1.
19. BLANCO, J.R.; RAOULT, D. 2005. Enfermedades producidas por *Bartonella* spp. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 23, no. 5, pp. 313-320. ISSN 0213005X. DOI 10.1157/13074971.
20. BRAGA, M. do S.C. de O.; DINIZ, P.P.; ANDRÉ, M.R.; BORTOLI, C.P.; MACHADO, R.Z. 2012. Molecular characterisation of *Bartonella* species in cass from São Luís, state of Maranhão, north-eastern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 107, no. 6, pp. 772-777. ISSN 00740276. DOI 10.1590/S0074-02762012000600011.
21. BRENNER, D.J.; O'CONNOR, S.P.; HOLLIS, D.G.; WEAVER, R.E.; STEIGERWALT, A.G. 1991. Molecular characterization and proposal of a neotype strain for *Bartonella bacilliformis*. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 29, pp. 1299-1302. ISSN 00951137.
22. BRENNER, D.J.; O'CONNOR, S.P.; WINKLER, H.H.; STEIGERWALT, A.G. 1993. Proposals To Unify the Genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with Descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov.; *Bartonella vinsonii* comb. nov.; *Bartonella henselae* comb. nov.; and *Bartonella elizabethae* comb. nov.; and To Remove the Family *Bartonellaceae* f. *International Journal of*

- Systematic Bacteriology*, vol. 43, pp. 777-786. ISSN 0020-7713. DOI 10.1099/00207713-43-4-777.
23. CADENAS, M.B.; BRADLEY, J.; MAGGI, R.G.; TAKARA, M.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. 2008. Molecular characterization of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* genotype III. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 46, no. 5, pp. 1858-1860. ISSN 00951137. DOI 10.1128/JCM.02456-07.
24. CARROLL, J.A.; COLEMAN, S.A.; SMITHERMAN, L.S.; MINNICK, M.F. 2000. Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*. *Infection and Immunity*, vol. 68, no. 12, pp. 6750-6757. ISSN 00199567. DOI 10.1128/IAI.68.12.6750-6757.2000.
25. CASE, R.J.; BOUCHER, Y.; DAHLLÖF, I.; HOLMSTRÖM, C.; DOOLITTLE, W.F.; KJELLEBERG, S. 2007. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 1, pp. 278-288. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.01177-06.
26. CASTILLO, R.; TERRONES, C.; YABAR, D.; VENTOSILLA, P. 2008. Conocimientos, actitudes y prácticas respecto a la bartonelosis aguda (fiebre de la Oroya) en los pobladores del distrito de Ollantaytambo, provincia de Urubamba, en el Valle Sagrado de los Incas, Cusco, Perú. *Acta Med Per*, vol. 25, no. 2, pp. 58-62.
27. CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.J.; BREITSCHWERDT, E.B. 2005. Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 224, no. 8, pp. 1270-1279. ISSN 0003-1488. DOI 10.2460/javma.2004.224.1270.
28. CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.-J.; MARUYAMA, S.; BREITSCHWERDT, E.B. 2006. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. *Emerging infectious diseases*, vol. 12, pp. 389-394. ISSN 1080-6040. DOI 10.3201/eid1205.050931.
29. CHOMEL, B.B.; MOLIA, S.; KASTEN, R.W.; BORGO, G.M.; STUCKEY, M.J.; MARUYAMA, S.; CHANG, C.C.; HADDAD, N.; KOEHLER, J.E. 2016. Isolation of *Bartonella henselae* and Two New *Bartonella* Subspecies, *Bartonella koehlerae* Subspecies *boulouisii* subsp. nov. and *Bartonella koehlerae* Subspecies *bothieri* subsp. nov. from Free-Ranging Californian

- Mountain Lions and Bobcats. *PloS one*, vol. 11, no. 3, pp. e0148299. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0148299.
30. CHUNG, J.; HAN, T.; KIM, B.; YOO, Y.; LIM, S. 2005. Detection of *Bartonella henselae* DNA by Polymerase Chain Reaction in a Patient with Cat Scratch Disease : A Case Report. *J Korean Med Sci* [en línea], vol. 20, no. 5, pp. 888-891. DOI 10.3346/jkms.2005.20.5.888. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2779292/>.
 31. CLARRIDGE, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 17, no. 4, pp. 840-862. ISSN 08938512. DOI 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.
 32. COLEMAN, S.A.; MINNICK, M.F. 2001. Establishing a direct role for the *Bartonella bacilliformis* invasion-associated locus B (la1B) protein in human erythrocyte parasitism. *Infection and Immunity*, vol. 69, no. 7, pp. 4373-4381. ISSN 00199567. DOI 10.1128/IAI.69.7.4373-4381.2001.
 33. DABO, S.M.; CONFER, A.W.; ANDERSON, B.E.; GUPTA, S. 2006. *Bartonella henselae* Pap31, an extracellular matrix adhesin, binds the fibronectin repeat III13 module. *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 5, pp. 2513-2521. ISSN 00199567. DOI 10.1128/IAI.74.5.2513-2521.2006.
 34. DAHLLOF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG, S. 2000. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 8, pp. 3376-3380. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.66.8.3376-3380.2000.
 35. DEHIO, C.; LANZ, C.; POHL, R.; BEHRENS, P.; BERMOND, D.; PIÉMONT, Y.; PELZ, K.; SANDER, A. 2001. *Bartonella schoenbuchii* sp. nov.; isolated from the blood of wild roe deer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 51, pp. 1557-1565. ISSN 14665026. DOI 10.1099/00207713-51-4-1557.
 36. DEHIO, C. 2004. Molecular and Cellular Basis of *Bartonella* Pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, vol. 58, no. 1, pp. 365-390. ISSN 0066-4227. DOI 10.1146/annurev.micro.58.030603.123700.
 37. DEL VALLE, L.; JARAMILLO, M.; TALLEDO, M.; PONS, M.; FLORES, L.; QUISPE, R.; RAMÍREZ, P.; GARCÍA-DE-LA-GUARDA, R.; ALVARADO, D.; ESPINOZA-CULUPÚ, A.; DEL VALLE, J.; VARGAS, M.; RUÍZ, J. 2014.

- Development of a 16S rRNA PCR-RFLP Assay for *Bartonella* Identification: Applicability in the Identification of Species Involved in Human Infections. *Universal Journal of Microbiology Research*, vol. 2, no. 1, pp. 15-22. DOI 10.13189/ujmr.2014.020102.
38. DELIDOW, B.; LYNCH, J.; PELUSO, J.; WHITE, B. 1993. Polymerase chain reaction: basic protocols. *Methods in Molecular Biology* [en línea], vol. 15, pp. 1-29. DOI 10.1385/0-89603-244-2:1. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21400259>.
 39. DIDI, K.; CHAUDHRY, R.; SHARMA, N.; DHAWAN, B. 2013. Strategy for identification & characterization of *Bartonella henselae* with conventional & molecular methods. *Indian Journal of Medical Research*, vol. 137, no. 2, pp. 380-387. ISSN 09715916.
 40. DROZ, S.; CHI, B.; HORN, E.; STEIGERWALT, A.G.; WHITNEY, A.M.; BRENNER, D.J. 1999. *Bartonella koehlerae* sp. nov.; isolated from cats. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 37, pp. 1117-1122. ISSN 00951137.
 41. EDWARDS, M.C.; GIBBS, R.A. 1994. Multiplex PCR: Advantages, development, and applications. *Genome Research*, vol. 3, pp. S65-S75. ISSN 10889051. DOI 10.1101/gr.3.4.S65.
 42. EHRENBORG, C.; WESSLÉN, L.; JAKOBSON, A.; FRIMAN, G.; HOLMBERG, M. 2000. Sequence variation in the *ftsZ* gene of *Bartonella henselae* isolates and clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, no. 2, pp. 682-687. ISSN 00951137.
 43. EISENSTEIN, B. 1990. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med*, vol. 322, no. 3, pp. 178-183. DOI 10.1056/NEJM199001183220307.
 44. ELNIFRO, E.M.; ASHSHI, A.M.; COOPER, R.J.; KLAPPER, P.E. 2000. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 13, no. 4, pp. 559-570. ISSN 08938512. DOI 10.1128/CMR.13.4.559-570.2000.
 45. EREMEEVA, M.E.; GERNS, H.L.; LYDY, S.L.; GOO, J.S.; RYAN, E.T.; MATHEW, S.S.; FERRARO, M.J.; HOLDEN, J.M.; NICHOLSON, W.L.; DASCH, G.A.; KOEHLER, J.E. 2007. Bacteremia, Fever, and Splenomegaly Caused by a Newly Recognized *Bartonella* Species. *New England Journal of*

- Medicine*, vol. 356, pp. 2381-2387. ISSN 0028-4793. DOI 10.1056/nejmoa065987.
46. EWART, K.M.; FRANKHAM, G.J.; MCEWING, R.; THE, D.T.; HOGG, C.J.; WADE, C.; LO, N.; JOHNSON, R.N. 2018. A rapid multiplex PCR assay for presumptive species identification of rhinoceros horns and its implementation in Vietnam. *PloS one*, vol. 13, no. 6, pp. e0198565. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0198565.
 47. FERRÉS, M.; ABARCA, K.; GODOY, P.; GARCÍA, P.; PALAVECINO, B.; MÉNDEZ, G.; VALDÉS, A.; ERNST, S.; THIBAUT, J.; KOBERG, J.; CHANQUEO, L.; VIAL, P. 2005. Presencia de *Bartonella henselae* en gatos: Cuantificación del reservorio natural y riesgo de exposición humana de esta zoonosis en Chile. *Revista Medica de Chile*, vol. 133, pp. 1465-1471. ISSN 00349887.
 48. FLORES, L.E. *Estudios moleculares en Bartonella bacilliformis para el control de la enfermedad de Carrión*. Tesis Grado de Magister, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2008
 49. FONTALVO, M.C.; FAVACHO, A.R. de M.; ARAUJO, A. de C.; SANTOS, N.M. dos, OLIVEIRA, G.M.B. de, AGUIAR, D.M.; LEMOS, E.R.S. de; HORTA, M.C. 2017. *Bartonella* species pathogenic for humans infect pets, free-ranging wild mammals and their ectoparasites in the Caatinga biome, Northeastern Brazil: a serological and molecular study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, vol. 21, no. 3, pp. 290-296. ISSN 16784391. DOI 10.1016/j.bjid.2017.02.002.
 50. FOUCAULT, C.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. 2006. *Bartonella quintana* characteristics and clinical management. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 12, no. 2, pp. 217-223. ISSN 10806059. DOI 10.3201/eid1202.050874.
 51. FRANK, H.K.; BOYD, S.D.; HADLY, E.A. 2018. Global fingerprint of humans on the distribution of *Bartonella* bacteria in mammals. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 12, no. 11, pp. e0006865. ISSN 19352735. DOI 10.1371/journal.pntd.0006865.
 52. FUHRMANN, O.; ARVAND, M.; GÖHLER, A.; SCHMID, M.; KRÜLL, M.; HIPPENSTIEL, S.; SEYBOLD, J.; DEHIO, C.; SUTTORP, N. 2001. *Bartonella henselae* induces NF-κB-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: Possible role of outer membrane proteins

- as pathogenic factors. *Infection and Immunity*, vol. 69, no. 8, pp. 5088-5097. ISSN 00199567. DOI 10.1128/IAI.69.8.5088-5097.2001.
53. GARCÍA-ESTEBAN, C.; GIL, H.; RODRÍGUEZ-VARGAS, M.; GERRIKAGOITIA, X.; BARANDIKA, J.; ESCUDERO, R.; JADO, I.; GARCÍA-AMIL, C.; BARRAL, M.; GARCÍA-PÉREZ, A.L.; BHIDE, M.; ANDA, P. 2008. Molecular method for *Bartonella* species identification in clinical and environmental samples. *Journal of Clinical Microbiology*, ISSN 00951137. DOI 10.1128/JCM.01720-07.
 54. GARRE, L.; GUARAGLIA, W.; CUATZ, D.; KAUFMAN, S.; GIL, H.; DE ROSA, A.F. 2008. Endocarditis infecciosa producida por *Bartonella quintana*. *Medicina*, vol. 68, pp. 144-146. ISSN 00257680.
 55. GARRIDO, P. 2016. Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP. Ventajas en el Diagnóstico Sanitario. *Revista Científica Ecuatoriana*, vol. 3, pp. 11-14.
 56. GOMES, C.; MARTINEZ-PUCHOL, S.; PONS, M.J.; BAZÁN, J.; TINCO, C.; DEL VALLE, J.; RUIZ, J. 2016. Evaluation of PCR Approaches for Detection of *Bartonella bacilliformis* in Blood Samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 10, no. 3, pp. e0004529. ISSN 19352735. DOI 10.1371/journal.pntd.0004529.
 57. GOMES, C.; RUIZ, J. 2018. Carrion's disease: The sound of silence. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 31, no. 1, pp. e00056-17. ISSN 10986618. DOI 10.1128/CMR.00056-17.
 58. GONZÁLES, C.; MAGUIÑA, C.; HERAS, F.; CONDE-SALAZAR, L. 2007. Bartonellosis (Fiebre de la Oroya o Verruga Peruana): ¿Enfermedad ocupacional? *Medicina y Seguridad del Trabajo*, vol. 53, no. 209, pp. 35-41. DOI 10.4321/s0465-546x2007000400006.
 59. GUNDI, V.A.K.B.; TAYLOR, C.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. 2009. *Bartonella rattaaustraliani* sp. nov.; *Bartonella queenslandensis* sp. nov. and *Bartonella coopersplainsensis* sp. nov.; identified in Australian rats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 59, pp. 2956-2961. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijs.0.002865-0.
 60. GURTNER, V.; MAYALL, B.C. 1999. rDNA spacer rearrangements and concerted evolution. *Microbiology*, vol. 145, pp. 2-3. ISSN 13500872. DOI 10.1099/13500872-145-1-2.

61. HAAKE, D.A.; SUMMERS, T.A.; MCCOY, A.M.; SCHWARTZMAN, W. 1997. Heat shock response and *groEL* sequence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana*. *Microbiology*, vol. 143, pp. 2807-2815. ISSN 13500872. DOI 10.1099/00221287-143-8-2807.
62. HALL, T.A. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, vol. 41, pp. 95-98.
63. HAMBUCH, T.M.; HANDLEY, S.A.; ELLIS, B.; CHAMBERLIN, J.; ROMERO, S.; REGNERY, R. 2004. Population genetic analysis of *Bartonella bacilliformis* isolates from areas of Peru where Carrion's disease is endemic and epidemic. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, no. 8, pp. 3675-3680. ISSN 00951137. DOI 10.1128/JCM.42.8.3675-3680.2004.
64. HARMS, A.; DEHIO, C. 2012. Intruders below the Radar: Molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 25, no. 1, pp. 42-78. ISSN 08938512. DOI 10.1128/CMR.05009-11.
65. HELLER, R.; KUBINA, M.; MARIET, P.; RIEGEL, P.; DELACOUR, G.; DEHIO, C.; LAMARQUE, F.; KASTEN, R.; BOULOUIS, H.-J.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.; PIEMONT, Y. 2009. *Bartonella alsatica* sp. nov.; a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 49, pp. 283-288. ISSN 0020-7713. DOI 10.1099/00207713-49-1-283.
66. HELLER, R.; RIEGEL, P.; HANSMANN, Y.; DELACOUR, G.; BERMOND, D.; DEHIO, C.; LAMARQUE, F.; MONTIEL, H.; CHOMEL, B.; PIEMONT, Y. 1998. *Bartonella tribocorum* sp. nov.; a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 48, pp. 1333-1339. ISSN 0020-7713. DOI 10.1099/00207713-48-4-1333.
67. HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.A.; DLOUHY, S.R.; VANCE, G.H.; VOGT, P.H. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, vol. 23, pp. 504-511. ISSN 07366205.
68. HENRIQUEZ-CAMACHO, C.; VENTOSILLA, P.; MINNICK, M.F.; RUIZ, J.; MAGUIÑA, C. 2015. Proteins of *Bartonella bacilliformis*: Candidates for Vaccine Development. *International Journal of Peptides*, vol. 2015, no. 702784, pp. 1-6.

69. HERCÍK, K.; HÁŠOVÁ, V.; JANEČEK, J.; BRANNY, P. 2007. Molecular evidence of *Bartonella* DNA in ixodid ticks in Czechia. *Folia Microbiologica*, vol. 52, no. 5, pp. 503-509. ISSN 00155632. DOI 10.1007/BF02932111.
70. HOUPIKIAN, P.; RAOULT, D. 2001. 16S/23S rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis, identification, and subtyping of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol*, vol. 39, no. 8, pp. 2768-2778. DOI 10.1128/JCM.39.8.2768-2778.2001.
71. HUARCAYA, E.; MAGUIÑA, C.; MERELLO, J.; COK, J.; BIRTLES, R.; INFANTE, B.; VIDAL, J.; TELLO, A.; VENTOSILLA, P., 2002. A prospective study of Cat-Scratch Disease in Lima-Peru. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, vol. 44, no. 6, pp. 325-330. ISSN 00364665. DOI 10.1590/S0036-46652002000600006.
72. INOUE, K.; KABEYA, H.; SHIRATORI, H.; UEDA, K.; KOSOY, M.Y.; CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.J.; MARUYAMA, S. 2010. *Bartonella japonica* sp. nov. and *Bartonella silvatica* sp. nov.; isolated from *Apodemus* mice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 60, pp. 759-763. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijs.0.011528-0.
73. INOUE, K.; MARUYAMA, S.; KABEYA, H.; YAMADA, N.; OHASHI, N.; SATO, Y.; YUKAWA, M.; MASUZAWA, T.; KAWAMORI, F.; KADOSAKA, T.; TAKADA, N.; FUJITA, H.; KAWABATA, H. 2008. Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* species isolated from wild rodents in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 16, pp. 5086-5092. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.00071-08.
74. JACOMO, V.; KELLY, P.J.; RAOULT, D. 2002. Natural History of *Bartonella* Infections (an Exception to Koch's Postulate). *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 9, no. 1, pp. 8-18. ISSN 1556-6811. DOI 10.1128/cdli.9.1.8-18.2002.
75. JENSEN, W.A.; FALL, M.Z.; ROONEY, J.; KORDICK, D.L.; BREITSCHWERDT, E.B. 2000. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, pp. 1717-1722. ISSN 00951137.
76. JOHNSON, G.; AYERS, M.; MCCLURE, S.C.C.; RICHARDSON, S.E.; TELLIER, R. 2003. Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase

- gene (ribC). *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 3, pp. 1069-1072. ISSN 00951137. DOI 10.1128/JCM.41.3.1069-1072.2003.
77. JONES, K.E.; PATEL, N.G.; LEVY, M.A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J.L.; DASZAK, P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, vol. 451, pp. 990-994. ISSN 14764687. DOI 10.1038/nature06536.
78. JONES, S.L.; MAGGI, R.; SHULER, J.; ALWARD, A.; BREITSCHWERDT, E.B., 2008. Detection of *Bartonella henselae* in the Blood of 2 Adult Horses. *J Vet Intern Med* [en línea], vol. 22, pp. 495–498. DOI 10.1111/j.1939-1676.2008.0043.x. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1939-1676.2008.0043.x>.
79. KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A.H. 2009. FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. *Genes, Genomes and Genomics*, vol. 3, no. 1, pp. 1-14.
80. KAWASATO, K.H.; OLIVEIRA, L.C. de; VELHO, P.E.N.F.; YAMAMOTO, L.; DEL NEGRO, G.M.B.; OKAY, T.S., 2013. Detection of *Bartonella henselae* DNA in clinical samples including peripheral blood of immune competent and immune compromised patients by three nested amplifications. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 55, no. 1, pp. 1-6. DOI 10.1590/s0036-46652013000100001.
81. KELLY, T.M.; PADMALAYAM, I.; BAUMSTARK, B.R. 1998. Use of the cell division protein FtsZ as a means of differentiating among *Bartonella* species. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 5, no. 6, pp. 766-772. ISSN 1071412X.
82. KEŠNEROVÁ, L.; MORITZ, R.; ENGEL, P. 2016. *Bartonella apis* sp. nov.; a honey bee gut symbiont of the class Alphaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 66, pp. 414-421. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijsem.0.000736.
83. KIRBY, J.E.; NEKORCHUK, D.M. 2002. *Bartonella*-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 99, no. 7, pp. 4656-4661. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.072292699.
84. KOEHLER, J.E.; SANCHEZ, M.A.; GARRIDO, C.S.; WHITFELD, M.J.; CHEN, F.M.; BERGER, T.G.; RODRIGUEZ-BARRADAS, M.C.; LEBOT,

- P.E.; TAPPERO, J.W. 1997. Molecular Epidemiology of *Bartonella* Infections in Patients with Bacillary Angiomatosis–Peliosis. *New England Journal of Medicine*, vol. 337, no. 26, pp. 1876-1883. ISSN 0028-4793. DOI 10.1056/nejm199712253372603.
85. KORDICK, D.L.; SWAMINATHAN, B.; GREENE, C.E.; WILSON, K.H.; WHITNEY, A.M.; O'CONNOR, S.; HOLLIS, D.G.; MATAR, G.M.; STEIGERWALT, A.G.; MALCOLM, G.B.; HAYES, P.S.; HADFIELD, T.L.; BREITSCHWERDT, E.B.; BRENNER, D.J. 1996. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* subsp. nov.; Isolated from Dogs; *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*; and Emended Description of *Bartonella vinsonii*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 46, no. 3, pp. 704-709. ISSN 0020-7713. DOI 10.1099/00207713-46-3-704.
86. KRUEGER, C.M.; MARKS, K.L.; IHLER, G.M. 1995. Physical map of the *Bartonella bacilliformis* genome. *Journal of Bacteriology*, vol. 177, no. 24, pp. 7271-7274. ISSN 00219193. DOI 10.1128/jb.177.24.7271-7274.1995.
87. LA SCOLA, B.; LIANG, Z.; ZEAITER, Z.; HOUPKIAN, P.; GRIMONT, P.A.D.; RAOULT, D. 2002. Genotypic characteristics of two serotypes of *Bartonella henselae*. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, no. 6, pp. 2002-2008. ISSN 00951137. DOI 10.1128/JCM.40.6.2002-2008.2002.
88. LA SCOLA, B.; ZEAITER, Z.; KHAMIS, A.; RAOULT, D. 2003. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: The *Bartonella* paradigm. *Trends in Microbiology*, vol. 11, no. 7, pp. 318-321. ISSN 0966842X. DOI 10.1016/S0966-842X(03)00143-4.
89. LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, vol. 23, no. 21, pp. 2947-2948. ISSN 13674803. DOI 10.1093/bioinformatics/btm404.
90. LAROCHE, M.; BERENGER, J.M.; MEDIANNIKOV, O.; RAOULT, D.; PAROLA, P. 2017. Detection of a Potential New *Bartonella* Species “*Candidatus Bartonella rondoniensis*” in Human Biting Kissing Bugs (Reduviidae; Triatominae). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 11, no. 1, pp. e0005297. ISSN 19352735. DOI 10.1371/journal.pntd.0005297.

91. LAWSON, P.; COLLINS, M. 1996. Description of *Bartonella clarridgeiae* sp. nov. isolated from the cat of a patient with *Bartonella henselae* septicemia. *Med. Microbiol. Lett.*; vol. 5, pp. 64-73.
92. LEE, A.K.; FALKOW, S. 1998. Constitutive and inducible green fluorescent protein expression in *Bartonella henselae*. *Infection and Immunity*, vol. 66, no. 8, pp. 3964-3967. ISSN 00199567.
93. LI, D.-M.; HOU, Y.; SONG, X.-P.; FU, Y.-Q.; LI, G.-C.; LI, M.; EREMEEVA, M.E.; WU, H.-X.; PANG, B.; YUE, Y.-J.; HUANG, Y.; LU, L.; WANG, J.; LIU, Q.-Y. 2015. High Prevalence and Genetic Heterogeneity of Rodent-Borne *Bartonella* Species on Heixiazi Island, China. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 81, pp. 7981-7992. ISSN 0099-2240. DOI 10.1128/aem.02041-15.
94. LI, W.; RAOULT, D.; FOURNIER, P.E 2007. Genetic diversity of *Bartonella henselae* in human infection detected with multispacer typing. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 13, no. 8, pp. 1178-1183. ISSN 10806059. DOI 10.3201/eid1308.070085.
95. LYDY, S.L.; EREMEEVA, M.E.; ASNIS, D.; PADDOCK, C.D.; NICHOLSON, W.L.; SILVERMAN, D.J.; DASCH, G.A. 2008. Isolation and characterization of *Bartonella bacilliformis* from an expatriate Ecuadorian. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 46, no. 2, pp. 627-637. ISSN 00951137. DOI 10.1128/JCM.01207-07.
96. LYDY, S.L.; LASCANO, M.S.; GARCIA-PEREZ, J.E.; WILLIAMS-NEWKIRK, A.J.; GRIJALVA, M.J. 2018. Seroprevalence and risk factors for infection with *Bartonella bacilliformis* in Loja province, Ecuador article. *Emerging Microbes and Infections*, vol. 7, no. 115. ISSN 22221751. DOI 10.1038/s41426-018-0110-5.
97. MAGGI, R.G.; HARMS, C.A.; HOHN, A.A.; PABST, D.A.; MCLELLAN, W.A.; WALTON, W.J.; ROTSTEIN, D.S.; BREITSCHWERDT, E.B. 2005. *Bartonella henselae* in porpoise blood. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 11, no. 12, pp. 1894-1898. ISSN 10806059. DOI 10.3201/eid1112.050969.
98. MAGGI, R.G.; KOSOY, M.; MINTZER, M.; BREITSCHWERDT, E.B. 2009. Isolation of candidatus *Bartonella melophagi* from human blood. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 15, no. 1, pp. 66-68. ISSN 10806040. DOI 10.3201/eid1501.081080.

99. MAGUIÑA, C.; GOTUZZO, E. 2000. Bartonellosis: New and old. *Infectious Disease Clinics of North America*, vol. 14, pp. 1-22. ISSN 08915520. DOI 10.1016/S0891-5520(05)70215-4.
100. MAGUIÑA, C.; UGARTE, C.; BREÑA, P.; ORDAYA, E.; VENTOSILLA, P.; HUARCAYA, E.; HENRIQUEZ, C. 2008. Actualización de la enfermedad de Carrión. *Revista Medica Herediana*, vol. 19, no. 1, pp. 36-41. ISSN 1018-130X. DOI 10.20453/rmh.v19i1.975.
101. MAILLARD, R.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BOUILLIN, C.; GANDOIN, C.; HALOS, L.; CHOMEL, B.; PIÉMONT, Y.; BOULOUIS, H.J. 2004a. Identification of *Bartonella* strains isolated from wild and domestic ruminants by a single-step PCR analysis of the 16S-23S intergenic spacer region. *Veterinary Microbiology*, vol. 98, pp. 63-69. ISSN 03781135. DOI 10.1016/j.vetmic.2003.09.022.
102. MAILLARD, R.; RIEGEL, P.; BARRAT, F.; BOULLIN, C.; THIBAUT, D.; GANDOIN, C.; HALOS, L.; DEMANCHE, C.; ALLIOT, A.; GUILLOT, J.; PIÉMONT, Y.; BOULOUIS, H.J.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. 2004b. *Bartonella chomelii* sp. nov.; isolated from French domestic cattle (*Bos taurus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 54, pp. 215-220. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijs.0.02770-0.
103. MANFREDI, R.; SABBATANI, S.; CHIODO, F. 2005. Bartonellosis: Light and shadows in diagnostic and therapeutic issues. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 11, no. 3, pp. 167-169. ISSN 1198743X. DOI 10.1111/j.1469-0691.2004.01010.x.
104. MARIÉ, J. Lou, FOURNIER, P.É.; ROLAIN, J.M.; BRIOLANT, S.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. 2006. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. elizabethae*, *B. koehlerae*, *B. doshiae*, *B. taylorii*, and *Rickettsia felis* in rodent fleas collected in Kabul, Afghanistan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 74, no. 3, pp. 436-439. ISSN 00029637.
105. MÁRQUEZ, C.; GARCÍA, R.; LEÓN, J.; ROSILES, R. 2014. Enfermedad de Carrión. *Revista latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio*, vol. 61, no. 4, pp. 246-252.
106. MARSTON, E.L.; SUMNER, J.W.; REGNERY, R.L. 1999. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 60 kDa heat-shock protein gene (*groEL*) of *Bartonella* species. *International Journal of Systematic*

- Bacteriology*, vol. 49, no. 3, pp. 1015-1023. ISSN 0020-7713. DOI 10.1099/00207713-49-3-1015.
107. MAVROULI, M.; VRIONI, G.; PAPAPARASKEVAS, J.; KAPSIMALI, V. 2016. *Bartonella* infections: Clinical manifestations, diagnostic techniques and treatment. *Acta Microbiologica Hellenica*, vol. 61, no. 1, pp. 17-35. ISSN 04389573.
 108. MCKEE, C.D.; KOSOY, M.Y.; BAI, Y.; OSIKOWICZ, L.M.; FRANKA, R.; GILBERT, A.T.; BOONMAR, S.; RUPPRECHT, C.E.; PERUSKI, L.F 2017. Diversity and phylogenetic relationships among *Bartonella* strains from Thai bats. *PLoS ONE*, vol. 12, no. 7, pp. e0181696. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0181696.
 109. MEDIANNIKOV, O.; EL KARKOURI, K.; DIATTA, G. ROBERT, C.; FOURNIER, P.E.; FENOLLAR, F. RAOULT, D.; 2013a. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Bartonella senegalensis* sp. nov. *Standards in Genomic Sciences*, vol. 8, no. 2, pp. 279-289. ISSN 20522975. DOI 10.1016/j.nmni.2016.03.004.
 110. MEDIANNIKOV, O.; KARKOURI, K. EL, ROBERT, C.; FOURNIER, P.E.; RAOULT, D. 2013b. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Bartonella florenciae* sp. nov. *Standards in Genomic Sciences*, vol. 9, no. 1, pp. 185-196. ISSN 19443277. DOI 10.4056/sigs.4358060.
 111. MINNICK, M.F.; STRANGE, J.C.; WILLIAMS, K.F 1994. Characterization of the 16S-23S rRNA intergenic spacer of *Bartonella bacilliformis*. *Gene*, vol. 143, pp. 149-150. ISSN 03781119. DOI 10.1016/0378-1119(94)90622-X.
 112. MINNICK, M.; ANDERSON, B. 2006. The Genus *Bartonella*. En: M. DWORKIN, S. FALKOW, E. ROSENBERG, K.-H. SCHLEIFER; E. STACKEBRANDT (eds.), *The Prokaryotes - A handbook on the biology of bacteria - Vol. 5*. 3rd. Minneapolis: Springer, pp. 467-492.
 113. MINNICK, M.F.; BATTISTI, J.M. 2009. Pestilence, persistence and pathogenicity: Infection strategies of *Bartonella*. *Future Microbiology*, vol. 4, pp. 743-758. ISSN 17460913. DOI 10.2217/fmb.09.41.
 114. MITCHELL, S.J.; MINNICK, M.F 1995. Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. *Infection and Immunity*, vol. 63, no. 4, pp. 1552-1562. ISSN 00199567.

115. MONTROYA, M.; MAGUIÑA, C.; VIGO, B.; CAPARO, R.; BRICEÑO, E.; ASTORGA, L.; VENTOSILLA, P.; PÉREZ, E.; GUERRA, H. 1998. Brote epidémico de enfermedad de Carrión en el Valle Sagrado de los Incas (Cuzco) Outbreak of *Bartonella* infections in the Sanctuary Valley from the Incas (Cuzco). *Bol. Soc. Peru. Med. Interna*, vol. 11, pp. 170-176.
116. MULLINS, K.E.; HANG, J.; JIANG, J.; LEGUIA, M.; KASPER, M.R.; VENTOSILLA, P.; MAGUIÑA, C.; JARMAN, R.G.; BLAZES, D.; RICHARDS, A.L. 2015. Description of *Bartonella ancashensis* sp. nov.; isolated from the blood of two patients with verruga peruana. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 65, pp. 3339-3343. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijsem.0.000416.
117. MULLIS, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, vol. 262, pp. 56-65. ISSN 00368733. DOI 10.1038/scientificamerican0490-56.
118. MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. 1987. Specific Synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*, vol. 155, pp. 335-350. ISSN 15577988. DOI 10.1016/0076-6879(87)55023-6.
119. NOGUCHI, H. 1928. Etiology of Oroya Fever: XI. Comparison of *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella muris*. Cultivation of *Bacterium murium*, n. sp. *The Journal of experimental medicine*, vol. 47, no. 2, pp. 219. DOI 10.1084/jem.47.2.219.
120. PACHAS, P. 2001. Enfermedad de Carrión (Bartonelosis) en el Perú. Instituto Nacional de Salud, Lima, 88 pp.
121. PADILLA, C.; CARRILLO, C.; BARBARA, E.; VENTURA, G.; G, M. 1998. Detección de *Bartonella bacilliformis* usando PCR-RFLP. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, vol. 15, no. 1-2, pp. 34-34.
122. PADILLA, C.; VENTURA, G. 2003a. Diseño y estandarización de una prueba PCR para el diagnóstico de Bartonelosis causada por *Bartonella bacilliformis*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, vol. 20, no. 1, pp. 5-7. ISSN 1726-4634.
123. PADILLA, C.; VENTURA, G. 2003b. Genotipificación de aislamientos de *Bartonella bacilliformis* por amplificación de elementos repetitivos mediante el uso de REP-PCR y ERIC-PCR. *Rev peru med exp salud publica*, vol. 20, no. 3, pp. 128-131.

124. PAROLA, P.; SHPYNOV, S.; MONTOYA, M.; LOPEZ, M.; HOUPIKIAN, P.; ZEAITER, Z.; GUERRA, H.; RAOULT, D. 2002. First molecular evidence of new *Bartonella* spp. in fleas and a tick from Perú. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 67, no. 2, pp. 135-136. ISSN 00029637.
125. PITULLE, C.; STREHSE, C.; BROWN, J.W.; BREITSCHWERDT, E.B. 2002. Investigation of the phylogenetic relationships within the genus *Bartonella* based on comparative sequence analysis of the *rnpB* gene, 16S rDNA and 23S rDNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 52, no. 6, pp. 2075-2080. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijs.0.02281-0.
126. POLANCO, P.M.; CORNEJO, M.; ZAPATA, E.; CALDERÓN, V.H.; MÁRQUEZ, P.; MAGUIÑA, C., 2008. Primer reporte de enfermedad sistémica por arañazo de gato (*Bartonella henselae*) en el Perú. *Acta méd. peru*, vol. 25, no. 4, pp. 228-231. ISSN 1018-8800.
127. PONS, M.J.; GOMES, C.; AGUILAR, R.; BARRIOS, D.; AGUILAR-LUIS, M.A.; RUIZ, J.; DOBAÑO, C.; DEL VALLE-MENDOZA, J.; MONCUNILL, G. 2017. Immunosuppressive and angiogenic cytokine profile associated with *Bartonella bacilliformis* infection in post-outbreak and endemic areas of Carrion's disease in Peru. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 11, no. 6, pp. e0005684. ISSN 19352735. DOI 10.1371/journal.pntd.0005684.
128. PONS, M.J.; SILVA-CASO, W.; DEL VALLE-MENDOZA, J.; RUIZ, J. 2016. Multi-Locus Sequence Typing of *Bartonella bacilliformis* DNA Performed Directly from Blood of Patients with Oroya's Fever During a Peruvian Outbreak. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 10, no. 1, pp. e0004391. ISSN 19352735. DOI 10.1371/journal.pntd.0004391.
129. RAMPERSAD, J.N.; WATKINS, J.D.; SAMLAL, M.S.; DEONANAN, R.; RAMSUBEIK, S.; AMMONS, D.R. 2005. A nested-PCR with an Internal Amplification Control for the detection and differentiation of *Bartonella henselae* and *B. clarridgeiae*: An examination of cats in Trinidad. *BMC Infectious Diseases*, vol. 5, pp. 63. ISSN 14712334. DOI 10.1186/1471-2334-5-63.
130. RENESTO, P.; GOUVERNET, J.; DRANCOURT, M.; ROUX, V.; RAOULT, D. 2001. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of

- Bartonella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 39, no. 2, pp. 430-437. ISSN 00951137. DOI 10.1128/JCM.39.2.430-437.2001.
131. ROLAIN, J.M.; FRANC, M.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. 2003. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 9, no. 3, pp. 338-342. ISSN 10806040. DOI 10.3201/eid0903.020278.
 132. ROLAIN, J.; BROUQUI, P.; KOEHLER, J.; MAGUINA, C.; DOLAN, M.; RAOULT, D. 2004. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 48, no. 6, pp. 1921-1933. DOI 10.1128/AAC.48.6.1921-1933.2004.
 133. ROMERO, S. 2004. *Detection of Bartonella bacilliformis by Real-Time PCR in Naturally Infected Sand Flies* [en línea]. S.I.: Uniformed Services University of the Health Sciences. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/4248/40897baf345fdd29b9c5035036d93bea02c2.pdf>.
 134. ROMERO, S. *Detección de Bartonella bacilliformis en Lutzomyias de Cusco por el método de PCR en tiempo real*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2017.
 135. ROUX, V.; RAOULT, D. 1995. The 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *Bartonella (Rochalimaea)* species is longer than usually described in other bacteria. *Gene*, vol. 156, no. 1, pp. 107-111. ISSN 03781119. DOI 10.1016/0378-1119(94)00919-J.
 136. ROUX, V.; RAOULT, D. 1995. Inter- and intraspecies identification of *Bartonella (Rochalimaea)* species. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 33, pp. 1573-1579. ISSN 00951137.
 137. SANDER, A.; POSSELT, M.; BÖHM, N.; RUESS, M.; ALTWEGG, M. 1999. Detection of *Bartonella henselae* DNA by two different PCR assays and determination of the genotypes of strains involved in histologically defined cat scratch disease. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 37, no. 4, pp. 993-997. ISSN 00951137.
 138. SANDER, A.; ZAGROSEK, A.; BREDET, W.; SCHILTZ, E.; PIEMONT, Y.; LANZ, C.; DEHIO, C. 2000. Characterization of *Bartonella clarridgeiae* flagellin (FlaA) and detection of anti-flagellin antibodies in patients with

- lymphadenopathy. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, no. 8, pp. 2943-2948. ISSN 00951137.
139. SATO, S.; KABEYA, H.; FUJINAGA, Y.; INOUE, K.; UNE, Y.; YOSHIKAWA, Y.; MARUYAMA, S. 2013. *Bartonella jaculi* sp. nov.; *Bartonella callosciuri* sp. nov.; *Bartonella pachyuromydis* sp. nov. and *Bartonella acomydis* sp. nov.; isolated from wild Rodentia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 63, pp. 1734-1740. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijls.0.041939-0.
140. SCHERER, D.C.; DEBURON-CONNORS, I.; MINNICK, M.F. 1993. Characterization of *Bartonella bacilliformis* flagella and effect of anti-flagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. *Infection and Immunity*, vol. 61, no. 12, pp. 4962-4971. ISSN 00199567.
141. SCHÜLEIN, R.; SEUBERT, A.; GILLE, C.; LANZ, C.; HANSMANN, Y.; PIÉMONT, Y.; DEHIO, C. 2001. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *The Journal of experimental medicine*, vol. 193, no. 9, pp. 1077-1086. ISSN 0022-1007.
142. SCHULTE FISCHEDICK, F.B.; STUCKEY, M.J.; AGUILAR-SETIÉN, A.; MORENO-SANDOVAL, H.; GALVEZ-ROMERO, G.; SALAS-ROJAS, M.; ARECHIGA-CEBALLOS, N.; OVERGAAUW, P.A.M.; KASTEN, R.W.; CHOMEL, B.B. 2016. Identification of *Bartonella* Species Isolated from Rodents from Yucatan, Mexico, and Isolation of *Bartonella vinsonii* subsp. *yucatanensis* subsp. nov. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 16, no. 10, pp. 636-642. ISSN 1530-3667. DOI 10.1089/vbz.2016.1981.
143. SMITHERMAN, L.S.; MINNICK, M.F. 2005. *Bartonella bacilliformis* GroEL: effect on growth of human vascular endothelial cells in infected cocultures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1063, pp. 286-298. ISSN 00778923. DOI 10.1196/annals.1355.046.
144. SUH, B.; CHUN, J.K.; YONG, D.; LEE, Y.S.; JEONG, S.H.; YANG, W.I.; KIM, D.S. 2010. A report of cat scratch disease in Korea confirmed by PCR amplification of the 16S-23S rRNA intergenic region of *Bartonella henselae*. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, vol. 30, no. 1, pp. 34. ISSN 15986535. DOI 10.3343/kjlm.2010.30.1.34.

145. TAYE, A.; CHEN, H.; DUNCAN, K.; ZHANG, Z.; HENDRIX, L.; GONZALEZ, J.; CHING, W. 2005. Production of recombinant protein Pap31 and its application for the diagnosis of *Bartonella bacilliformis* infection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1063, no. 1, pp. 280-285. ISSN 00778923. DOI 10.1196/annals.1355.045.
146. TOŁKACZ, K.; ALSARRAF, M.; KOWALEC, M.; DWUZNIAK, D.; GRZYBEK, M.; BEHNKE, J.M.; BAJER, A. 2018. *Bartonella* infections in three species of *Microtus*: Prevalence and genetic diversity, vertical transmission and the effect of concurrent *Babesia microti* infection on its success. *Parasites and Vectors*, vol. 11, no. 491. ISSN 17563305. DOI 10.1186/s13071-018-3047-6.
147. VAYSSIER-TAUSSAT, M.; RHUN, D. Le, DENG, H.K.; BIVILLE, F.; CESCOU, S.; DANCHIN, A.; MARIGNAC, G.; LENAOUR, E.; BOULOUIS, H.J.; MAVRIS, M.; ARNAUD, L.; YANG, H.; WANG, J.; QUEBATTE, M.; ENGEL, P.; SAENZ, H.; DEHIO, C. 2010. The Trw type IV secretion system of *Bartonella* mediates host-specific adhesion to erythrocytes. *PLoS Pathogens*, vol. 6, no. 6, pp. e1000946. ISSN 15537374. DOI 10.1371/journal.ppat.1000946.
148. VEGA, C.A.; ARIZA, R. 2008. Bartonellosis: Espectro clínico actual de un viejo patógeno. *Medicina Interna de Mexico*, vol. 24, no. 3, pp. 217-223. ISSN 01864866.
149. VENTURA, G.; PADILLA, C. 2006. *Diagnóstico bacteriológico de la bartonellosis humana o Enfermedad de Carrión*. 2006. Lima: s.n. ISBN 9972-857-57-3.
150. VIEZENS, J.; ARVARD, M. 2008. Simultaneous presence of two different copies of the 16S rRNA gene in *Bartonella henselae*. *Microbiology*, vol. 154, no. 9, pp. 2881-2886. ISSN 13500872. DOI 10.1099/mic.0.2008/018630-0.
151. WELCH, D.F.; CARROLL, K.C.; HOFMEISTER, E.K.; PERSING, D.H.; ROBISON, D.A.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D.J. 1999. Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*, from a cattle rancher: Identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among naturally infected mice. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 37, pp. 2598-2601. ISSN 00951137.

152. WHITE, T.J.; MADEJ, R.; PERSING, D.H. 1992. The polymerase chain reaction: Clinical applications. *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 29, pp. 161-196. ISSN 00652423. DOI 10.1016/S0065-2423(08)60224-3.
153. WHITNEY, A. *Bartonella Clarridgeiae: Invasion of Human Microvascular Endothelial Cells and Role of Flagella in Virulence*. Tesis Doctoral, Georgia State University, 2009.
154. XU, Y.; CHAI, Y. 2002. *Bartonella bacilliformis*- Molecular Mechanisms of Invasion. *Einstein Quart. J. Biol. Med.*; vol. 19, pp. 5856-6.
155. ZEAITER, Z.; FOURNIER, P.E.; OGATA, H.; RAOULT, D. 2002. Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing *groEL* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 52, pp. 165-171. ISSN 14665026. DOI 10.1099/00207713-52-1-165.
156. ZEAITER, Z.; LIANG, Z.; RAOULT, D. 2002. Genetic classification and differentiation of *Bartonella* species based on comparison of partial *ftsZ* gene sequences. *Journal of clinical microbiology*, vol. 40, no. 10, pp. 3641-3647. ISSN 0095-1137.

9.2 Fuentes electrónicas

1. PCR Methods—Top Ten Strategies. ThermoFisher Scientifics. [Consulta: 01 Mayo 2019]. Disponible en: https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/Cloning/Images/0616/pcr-methods-WE41324_Fig07.jpg
2. *In silico* PCR amplification. [Consulta: 01 febrero 2018]. Disponible en: <http://insilico.ehu.es/PCR/>

10. ANEXOS



Figura 15. Interfase parcial del Programa BIOEDIT. Interfase parcial del programa bioinformático Bioedit Sequence Analysis Editor v7.0.0 ©1997-2007 Tom Hall (Hall, 1999) con dos secuencias genómicas cargadas para alineamiento, como se hizo en el caso de *Bartonella*.

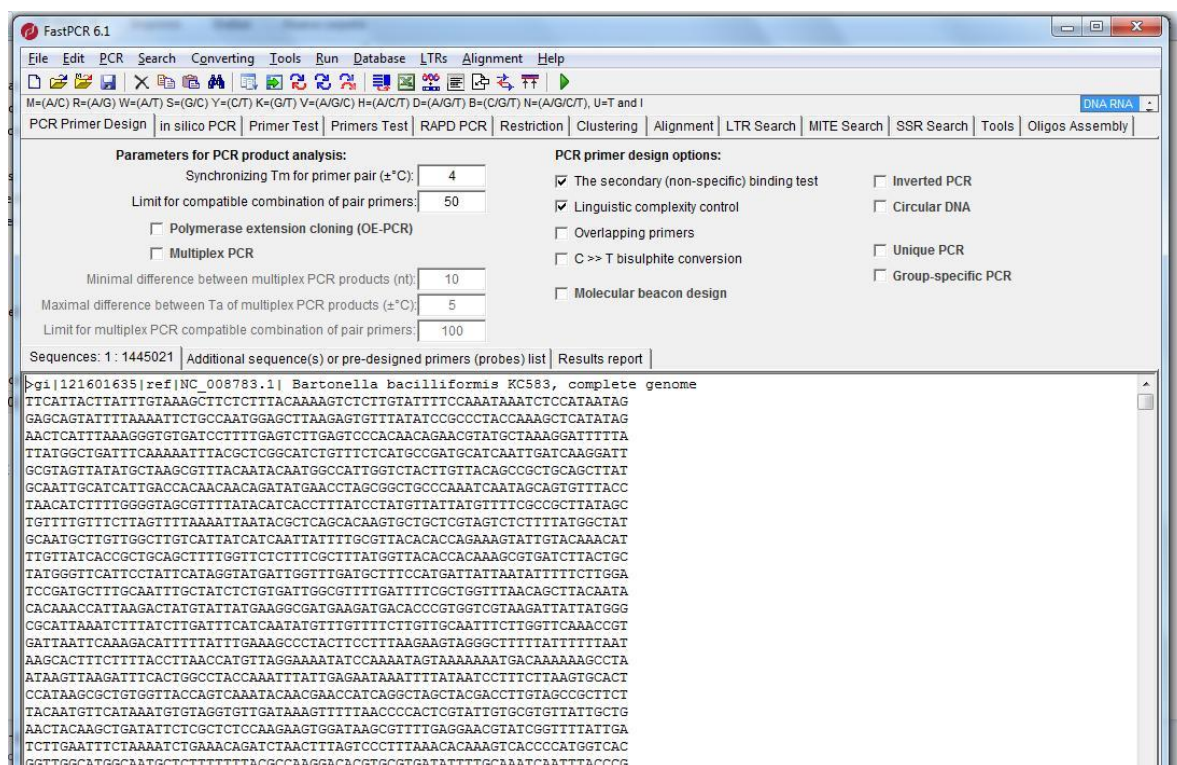


Figura 16. Interfase parcial del programa FastPCR. Interfase parcial del programa bioinformático FastPCR Professional 6.1.47 beta 3 ©1999-2010 Ruslan Kalendar y ©2006-2010 PrimerDigital Ltd (Kalendar *et al.*, 2009), con una secuencia genómica cargada, en uno de los ensayos PCR *in silico*, tal como se hizo en el caso de *Bartonella*.

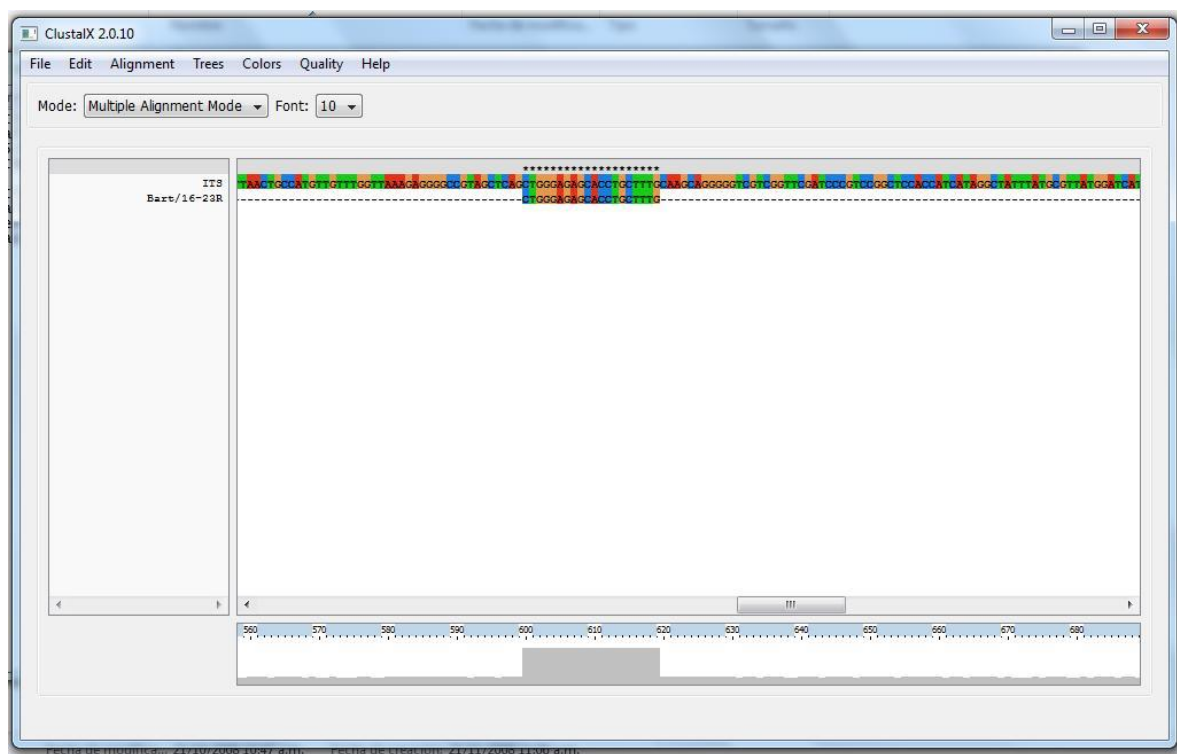


Figura 17. Interfase del programa ClustalX. Interfase del programa bioinformático ClustalX v2.0.10 ©2007 The European Bioinformatics Institute (Larkin, *et al.*, 2007), con una secuencia cargada para comprobar la especificidad de los cebadores diseñados, tal como se hizo en el caso de *Bartonella bacilliformis*.

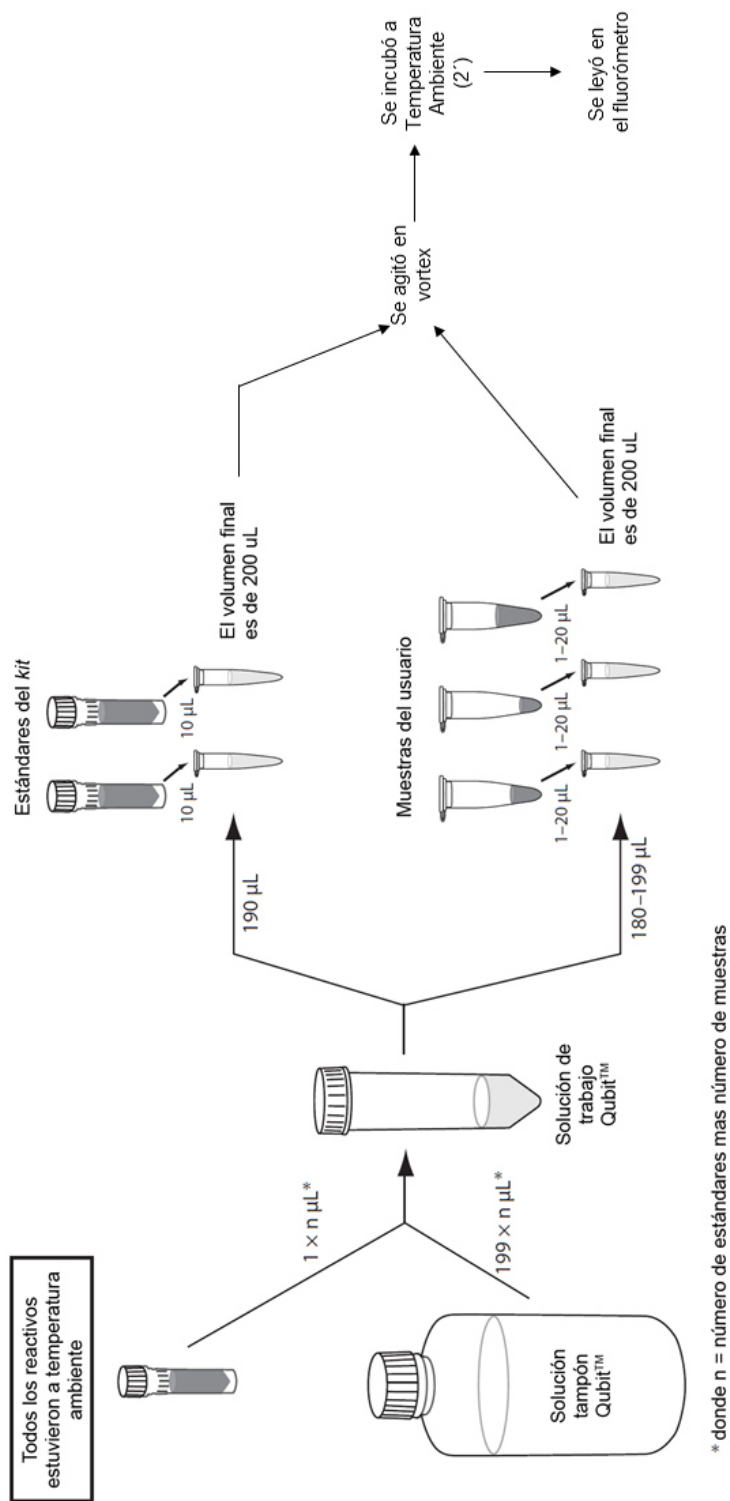


Figura 18. Esquema del protocolo seguido para el cálculo de la concentración de DNA de *Bartonella*, siguiendo las instrucciones del fabricante del fluorómetro Qubit, Invitrogen™.